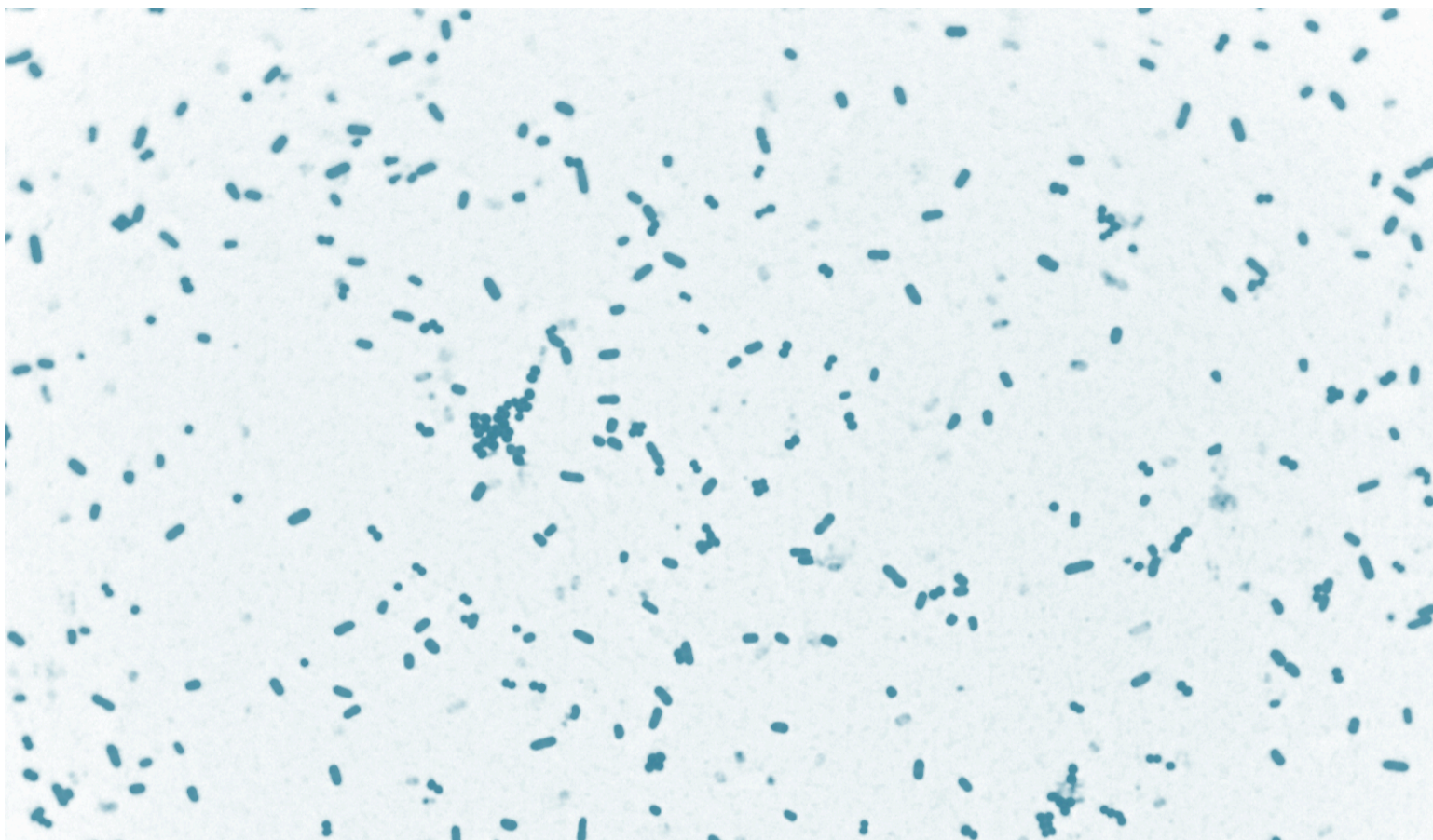




UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA DE SANITAT UNIVERSAL I SALUT PÚBLICA



ESTUDIO DE COLIFORMES TOTALES Y *E. COLI* EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO POR NMP: VALIDACIÓN Y RESULTADOS

Autor —Inés Chapa Chordá

Grado en Biotecnología

Curso Académico 2015 - 2016

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

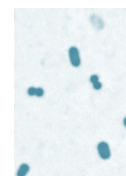
Universitat Politècnica de València

Tutor —Consuelo Sabater Marco

Cotutor —María Luisa Camaró Sala

Valencia, 7 julio de 2016

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial-Sin Obra Derivada”



ESTUDIO DE COLIFORMES TOTALES Y *E. COLI* EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO POR NMP: VALIDACIÓN Y RESULTADOS

Autor —Inés Chapa Chordá
Tutor —Consuelo Sabater Marco
Cotutor —Maria Luisa Camaró Sala

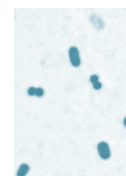
Valencia, 7 de julio de 2016

RESUMEN

La presencia de *Escherichia coli* y coliformes totales en aguas de consumo humano se debe principalmente a contaminación de origen fecal, por lo que estas bacterias son empleadas como indicadores de calidad del agua. Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objeto el estudio de estos microorganismos por el método del Número más probable descrito en la norma ISO 9308-2:2012, basado en la Tecnología de Sustrato Definido y el sistema *Quanti-Tray* de Laboratorios *IDEXX*. También recoge la sistemática seguida para la validación del método, así como los resultados obtenidos a partir de muestras analizadas durante 8 meses a lo largo de los años 2015 y 2016 en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia. Estos resultados también nos permitirán determinar los tipos de aguas de consumo humano más afectados por contaminación fecal.

Para llevar a cabo la validación del método se emplearon muestras de aguas de consumo humano, de diferentes orígenes, que fueron llegando al laboratorio para su análisis ordinario. Los parámetros estudiados para declarar la validez del método fueron la recuperación como una medida de la exactitud, y la reproducibilidad como una medida de la precisión. El valor requerido para la exactitud se obtuvo de la HPA (*Health Protection Agency*), y para la precisión el valor se extrajo de las tablas para el cálculo de incertidumbres del NMP.

Palabras clave: coliformes totales, *Escherichia coli*, validación, precisión, exactitud, recuperación, reproducibilidad, NMP.



TOTAL COLIFORMS AND *E. COLI* STUDY IN DRINKING WATER BY MPN METHOD: VALIDATION AND RESULTS

Author —Inés Chapa Chordá

Tutor —Consuelo Sabater Marco

Supervisor —Maria Luisa Camaró Sala

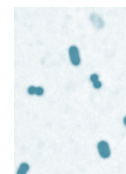
Valencia, 7th of July 2016

ABSTRACT

The presence of *Escherichia coli* and total coliforms in water is mainly due to faecal origin contamination; for this reason these bacteria are widely used as quality water indicators. This project consists on the study of these microorganisms by the Most probable number method described on the ISO 9308-2:2012 policy, which is based on the Substrate Defined Technology and the *Quanti-Tray* system (IDEXX Laboratories). It also includes the systematic followed for this method validation at the Public Health Laboratory of Valencia, and all the results obtained from the application of this method in the treatment of samples processed during 8 months along the years 2015 and 2016 at this official laboratory. The data collection obtained from these results also allows determining the types of drinking water that suffer the most from faecal contamination.

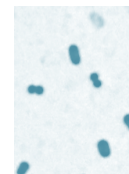
To perform the validation of the method, water samples coming from different origins and arriving at the laboratory for ordinary analysis were employed. The parameters used to state the validity of the method were the recovery as a measure of accuracy, and reproducibility as a measure of precision. The value required for fixing the reference accuracy was obtained from the Health Protection Agency, and the one required for the precision was obtained from the tables for the calculation of uncertainties of the MPN method.

Key words: total coliforms, *Escherichia coli*, validation, accuracy, precision, recovery, reproducibility, MPN.

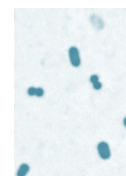


ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA DE LA VIGILANCIA Y CONTROL MICROBIOLÓGICO EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO	1
1.2. LEGISLACIÓN NACIONAL	2
1.3. COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> —INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL	3
1.3.1. Taxonomía y características bioquímicas	4
1.3.2. Enfermedades asociadas	5
1.3.3. Métodos de ensayo para la detección de bacterias indicadoras de contaminación fecal	5
1.3.3.1. NMP—Método del tubo múltiple	6
1.3.3.2. Método de filtración en membrana	7
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. EQUIPOS Y MATERIALES	7
3.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO <i>COLILERT-18</i>	8
3.3. NMP—MÉTODO DE DILUCIÓN ÚNICA	8
3.3.1. Fundamento del método	8
3.3.2. Procedimiento experimental	9
3.3.2.1. Preparación	9
3.3.2.2. Realización	10
3.3.3. Recuento	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. FUNDAMENTOS DEL PROCESO DE VALIDACIÓN	11
4.1.1. Flujo general de validación de un método de ensayo	12
4.2. CONTROLES PARA EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	13
4.2.1. Control interno	13
4.2.2. Control externo	13
4.3. SISTEMÁTICA DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO NMP DE DILUCIÓN ÚNICA	14
4.3.1. Preparación de las muestras	15
4.3.2. Preparación del inóculo	15
4.3.3. Inoculación y análisis de las muestras	17
4.3.4. Recogida de datos	17
4.4. TRATAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS	17
4.4.1. Requisitos de la validación—Exactitud y Precisión	17
4.4.2. Resultados—Cálculo e interpretación	20



4.5. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR EL MÉTODO VALIDADO: AÑO 2015 Y PRINCIPIOS DE 2016	26
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA	29
7. REFERENCIAS LEGISLATIVAS	31
8. ANEXOS	32
ANEXO I. FICHAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE VALENCIA	32
Anexo I.A. Ficha de trabajo F0007	32
Anexo I.B. Ficha de trabajo F0009	33
ANEXO II. HOJA DE CÁLCULO DE VALIDACIÓN Y CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE ENSAYOS DE RECuento POR NMP EN MICROBIOLOGÍA DEL LSPV	34



LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Diagrama de los mecanismos de contaminación fecal en aguas y alimentos de consumo humano.	1
---	---

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2. (A) Dispositivo <i>Quanti-Tray</i> y (B) bandeja de 51 pocillos.	8
Figura 3. (A) Metabolización de ONPG por el enzima β -galactosidasa en bacterias coliformes y (B) metabolización de MUG por el enzima β -glucuronidasa en <i>Escherichia coli</i> .	9
Figura 4. Realización del procedimiento experimental del método NMP de dilución única: (A) y (B) paso 2, (C) paso 4, (D) paso 5 y (E) paso 6.	7
Figura 5. Bolsa <i>Quanti-Tray</i> con 18 pocillos positivos para coliformes totales (A) y un pocillo positivo para <i>E. coli</i> (B).	11

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 6. Diagrama de la sistemática seguida para la validación del método NMP de dilución única.	12
Figura 7. Gráfico de columnas que representa (eje x) el origen y (eje y) la cantidad de muestras de agua de consumo humano empleadas para la validación del método de ensayo.	15
Figura 8. Placas de TSA con colonias de <i>Escherichia coli</i> bajo lupa con fuente inferior de luz.	16
Figura 9. Gráfico comparativo sobre los resultados obtenidos mensualmente a partir del método validado: (A) año 2015 y (B) año 2016.	27
Figura 10. Gráfico porcentual de muestras positivas para coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> según el origen de las muestras de agua de consumo humano.	28

LISTA DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Parámetros y valores paramétricos microbiológicos establecidos en la legislación para determinar que un agua es apta para consumo humano.	3
Tabla 2. Parámetros y valores paramétricos indicadores establecidos en la legislación para determinar que un agua es apta para consumo humano.	3
Tabla 3. Recuento de microorganismos viables en heces humanas pertenecientes a niños, adultos y ancianos en buen estado de salud.	5
Tabla 4. Métodos estandarizados ISO para la detección y recuento de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> por (A) NMP por diluciones —tubo múltiple— y por (B) filtración en membrana.	6

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Valores medios de los recuentos de colonias (ufc/ml) de <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i> y coliformes totales los días de realización de análisis para la validación.	16
Tabla 6. Rango de valores HPA asociado a cada puntuación HPA.	17
Tabla 7. Tabla estadística del método NMP para recuentos en muestras analizadas con <i>Colillert-18</i> y dispositivos <i>Quanti-Tray</i> .	18

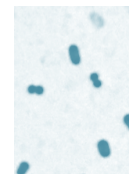
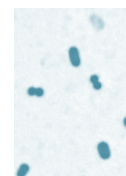


Tabla 8. Requisitos establecidos para la validación del método de recuento de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> en aguas de consumo humano por el método del NMP de dilución única.	20
Tabla 9. Valores y medias de los recuentos en TSA obtenidos a partir de los inóculos empleados a lo largo del proceso de validación del método NMP para el recuento de Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> .	20
Tabla 10. Resultados del método a validar para (A) coliformes totales y (B) <i>Escherichia coli</i> , con sus respectivas medias y límites superiores e inferiores.	21
Tabla 11. Valores logarítmicos de X e Y, y valores <i>HPA</i> obtenidos con su puntuación correspondiente para (A) coliformes totales y para (B) <i>E. coli</i> .	23
Tabla 12. Desviación estándar de reproducibilidad, incertidumbre intrínseca del método para cada par de valores y su media, e incertidumbre operacional correspondientes; datos asociados al recuento de (A) coliformes totales y (B) <i>Escherichia coli</i> .	25
Tabla 13. Resultados de la validación del método NMP para recuento de (A) coliformes totales y (B) <i>Escherichia coli</i> .	26

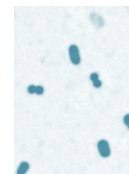
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Muestras totales analizadas en el LSPV por el método validado, muestras positivas para cualquier tipo de microorganismo, y muestras positivas para coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> .	27
---	----



NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

ACC	—Agar Cromogénico para Coliformes
ADE	—Agua Desionizada Estéril
BOE	—Boletín Oficial del Estado
CE	—Control Externo
CECT	—Colección Española de Cultivos Tipo
CI	—Control Interno
CNP	—Control Negativo del Proceso
CT	—Coliformes Totales
<i>DST</i>	— <i>Defined Substrate Technology</i>
EC	— <i>Escherichia coli</i>
EHEC	— <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EN	—European Norm
ENAC	—Entidad Nacional de Acreditación
EPEC	— <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETAP	—Estación de Tratamiento de Agua Potable
ETEC	— <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
HPA	— <i>Health Protection Agency</i>
ISO	— <i>International Standard Organization</i>
LIMS	— <i>Laboratory Information Management System</i>
LSPV	—Laboratorio de Salud Pública de Valencia
MUG	—4-metil-umbelliferil- β -D-glucurónico
NMP	—Número Más Probable
NT	—Nota Técnica
OMS	—Organización Mundial de la Salud
ONPG	—ortonitrofenol- β -D-galactopiranósido
Pee	—Procedimiento de Ensayo
<i>PHE</i>	— <i>Public Health England</i>
PI	—Procedimiento Interno
RD	—Real Decreto
TSA	—Trypteína Soya Agar
ufc	—Unidades formadoras de colonia
UV	—Ultra Violeta
UNE	—Una Norma Española



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de la vigilancia y control microbiológico en Aguas de Consumo Humano

Las enfermedades relacionadas con la contaminación del agua de consumo humano tienen una gran repercusión en la salud de la población global. El riesgo más común relacionado con este tipo de aguas son las enfermedades infecciosas producidas por agentes patógenos como bacterias, virus y parásitos (OMS, 2008). Se ha estimado que fallecen anualmente alrededor de 1,8 millones de personas a causa de enfermedades diarreicas y gastrointestinales, y que el 88% de las mismas son ocasionadas por el consumo de aguas insalubres y sometidas a condiciones de higiene no adecuadas (Martí *et al.*, 2013). Estos brotes infecciosos, aunque tienen una mayor incidencia en países en desarrollo, también se dan con frecuencia en países desarrollados (Cabral, 2010). Por estos motivos la calidad microbiológica de las aguas de consumo humano es de especial importancia para la sociedad actual (OMS, 2008), incluyendo a consumidores, proveedores, reguladores y autoridades de salud pública (Martí *et al.*, 2013).

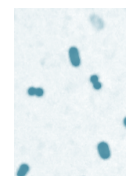
Las aguas de consumo humano que suponen un riesgo más elevado para la salud son las que están contaminadas por heces humanas o animales, pues éstas pueden ser fuente de patógenos. Por este motivo los patógenos de origen fecal son los microorganismos diana a la hora de establecer medidas de control para la protección de la salud, pues son un vehículo potencial de enfermedades de transmisión hídrica y pueden afectar a grandes grupos de población (Medema *et al.*, 2003) debido a diversos mecanismos de contaminación (PI-A, 2014), recogidos en la figura 1.



Figura 1. Diagrama de mecanismos de contaminación de agua y alimentos de consumo humano. Fuente: PI-A, 2014.

Para evitar las enfermedades de transmisión hídrica se llevan a cabo (a) métodos de tratamiento de aguas residuales antes de su eliminación o de su reutilización como agua contaminada, (b) métodos de purificación del agua para proporcionar agua potable y segura, y (c) procedimientos para examinar el agua y determinar su calidad microbiológica (PI-A, 2014), apartado que será abordado en el presente estudio.

En nuestro caso es el Plan de Salud de la Comunidad Valenciana, en su apartado correspondiente a *Salud y Medio Ambiente*, el que establece como línea de actuación garantizar el cumplimiento de los límites establecidos para la calidad del aire ambiente y las aguas (Consellería de Sanidad, 2005).



1.2. Legislación Nacional

La Organización Mundial de la Salud hace hincapié en que “las posibles consecuencias para la salud de la contaminación microbiana son tales que su control debe ser siempre un objetivo de importancia primordial y nunca debe comprometerse”, por ello cualquier medida destinada a mejorar la calidad del agua de consumo humano es susceptible de proporcionar un beneficio significativo para la salud (OMS, 2008). En consecuencia, todos los países del mundo establecen legislaciones muy estrictas sobre la calidad de las aguas de consumo humano (Martí *et al.*, 2013).

La legislación española vigente aplicada a este tipo de aguas es el Real Decreto 140/2003, del 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Según dicha legislación, que entró en vigor el 22 de febrero de 2003, se consideran aguas de consumo humano:

- i. Todas aquellas aguas empleadas para uso doméstico: beber, cocinar, preparar alimentos, higiene personal, etc.
- ii. Todas aquellas aguas utilizadas en la industria alimentaria para fines de fabricación, tratamiento, conservación o comercialización de productos destinados al consumo humano. También las utilizadas en la limpieza de las superficies, objetos y materiales que puedan estar en contacto con los alimentos.
- iii. Todas aquellas aguas suministradas para consumo humano como parte de una actividad comercial o pública.

Toda muestra de agua de consumo humano que derive de estos apartados se califica como “Apta para el consumo” o “No apta para el consumo”.

El control de la calidad del agua de consumo humano queda recogido en el Artículo 17 del RD 140/2003. Este control engloba:

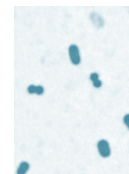
- El autocontrol del agua de consumo humano por el que, bajo la responsabilidad del gestor correspondiente, se llevan a cabo muestreos de distintos puntos de abastecimiento.
- La vigilancia sanitaria.
- El control en el grifo del consumidor.

La normativa que se aplica a aguas de consumo humano para determinar si son potables o no potables considera cuatro grupos de parámetros:

- i. Parámetros microbiológicos.
- ii. Parámetros químicos.
- iii. Parámetros indicadores
- iv. Radiactividad

De esta forma definimos como agua potable, apta para el consumo, a aquella agua libre de microorganismos causantes de enfermedad y/o sustancias químicas que afectan a la salud, mientras que un agua contaminada o no potable, no apta para el consumo, es aquella que ha estado en contacto con residuos domésticos o industriales.

En nuestro caso particular el estudio se ha centrado en (i) el primer y (iii) tercer grupo de parámetros —parámetros indicadores de contaminación microbiológica de las aguas—, y se ha realizado en la Unidad de Microbiología del Laboratorio de Salud Pública de Valencia. Tanto para el registro de las muestras como para la introducción de resultados y emisión de informes



se emplea el sistema de gestión de información *LIMS*, que permite asegurar la trazabilidad de las muestras.

En el Artículo 5 de la legislación se establecen los criterios de calidad de este tipo de aguas. A efectos de este RD, para que un agua de consumo humano sea salubre y limpia “no debe contener ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un riesgo para la salud humana”. Y, además, deberá cumplir con los parámetros microbiológicos e indicadores recogidos en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Parámetros y valores paramétricos microbiológicos establecidos en la legislación para determinar que un agua es apta para consumo humano. Fuente: RD 104/2003.

Parámetro	Valor paramétrico
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC en 100 ml
Enterococo	0 UFC en 100 ml
<i>Clostridium perfringens</i> —incluidas las esporas	0 UFC en 100 ml

Tabla 2. Parámetros y valores paramétricos indicadores establecidos en la legislación para determinar que un agua es apta para consumo humano. Fuente: RD 104/2003.

Parámetro	Valor paramétrico
Bacterias coliformes	0 UFC en 100 ml
Recuento de colonias a 22°C	0 UFC en 100 ml
A la salida de ETAP	100 UFC en 1 ml
En la red de distribución	Sin cambios anómalos

Cabe destacar que el incumplimiento de estos límites establecidos por la legislación puede ocasionar riesgos para la salud a corto plazo.

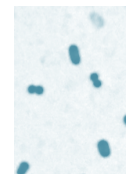
1.3. Coliformes totales y *Escherichia Coli* —Indicadores de contaminación fecal

Según los criterios de la OMS un microorganismo índice es aquel que señala la presencia de microorganismos patógenos, mientras que un microorganismo indicador es el empleado para medir la eficacia de un proceso (OMS, 2008).

De esta forma un indicador de contaminación fecal se define como aquel microorganismo inocuo de origen fecal cuya presencia está asociada a la de microorganismos patógenos y en consecuencia se emplea, fundamentalmente, para reflejar el riesgo potencial de presencia de agentes productores de enfermedades (Cabral, 2010). Los indicadores de calidad del agua nos permiten identificar la contaminación fecal de las aguas, determinar que los tratamientos y las desinfecciones aplicadas a las mismas son correctos, alertar sobre posibles contaminaciones y vigilar el estado general de los sistemas de distribución (Campos, 2001).

Un análisis microbiológico de aguas es el conjunto de operaciones que se realizan para determinar los microorganismos presentes en muestras problema. Es de vital importancia que las muestras tomadas para dicho análisis sean representativas para poder determinar con precisión su calidad microbiológica. Al realizar este tipo de análisis no aislamos o identificamos los microorganismos patógenos que contiene el agua, en su lugar se realiza una búsqueda de contaminación, de origen fecal en este caso, realizando un análisis de los “indicadores” de calidad (OMS, 2008).

No se buscan estos agentes patógenos de forma directa porque se encuentran en menor concentración que el resto de microorganismos y presentan una diversidad muy amplia, lo que



dificulta su detección. Empleamos, por tanto, microorganismos indicadores para evitar la detección y cuantificación de patógenos que necesitan metodologías más complejas, de mayor coste y que requieren mayores tiempos de análisis (Larrea *et al.*, 2013).

Los requerimientos necesarios para que un microorganismo sea adecuado como indicador de contaminación fecal son los siguientes (Cabral, 2010) (Larrea *et al.*, 2013):

- i. Estar presente en mayor concentración que los agentes patógenos, tanto en el intestino como en heces humanas y animales.
- ii. No ser patógeno en humanos.
- iii. Tener una detección sencilla, fiable y de bajo coste.
- iv. No proliferar en aguas naturales.
- v. Tener una persistencia en agua similar a la de los agentes patógenos fecales.
- vi. Responder a los procesos de tratamiento de forma similar a los patógenos.

No obstante, aunque diversos microorganismos cumplen estas características, las diversas jurisdicciones de cada país son las que determinan su uso como indicadores de contaminación fecal (Tallon *et al.*, 2005). Como se ha señalado en el apartado anterior, en España se emplean como indicadores de este tipo de contaminación (RD 140/2003):

- i. Bacterias coliformes:
 - Coliformes totales
 - *Escherichia coli*
- ii. Enterococos intestinales
- iii. *Clostridium perfringens*

Como se ha comentado previamente, este trabajo se centra particularmente en el estudio del recuento de las bacterias coliformes totales y de *Escherichia coli*.

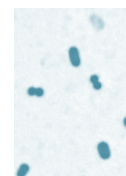
1.3.1. Taxonomía y características bioquímicas

Los coliformes totales engloban determinados géneros bacterianos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Todas estas bacterias coliformes presentan morfología bacilar, son Gram negativas y no esporuladas. Su crecimiento es aerobio y anaerobio facultativo en presencia de sales biliares, y son capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y aldehído a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en 48 horas (Tallon *et al.*, 2005). Son oxidasas negativas y expresan el enzima β -galactosidasa, característica fundamental para la aplicación del método de detección empleado en este trabajo (ISO 9308-2:2012).

Estas bacterias presentan ciertas desventajas como indicadores de contaminación fecal dado que no tienen un origen estrictamente fecal —habitan tanto el agua como el suelo y la vegetación— y no siempre están presentes durante los brotes de origen hídrico. Además, pueden sobrevivir y proliferar en los sistemas de distribución de aguas en forma de *biofilms* (Larrea *et al.*, 2013). Por estos motivos es necesario el empleo de otro microorganismo que determine con exactitud si la muestra analizada sufre contaminación de origen fecal.

Para complementar el estudio de calidad en muestras de aguas de consumo humano nos centramos en la detección de coliformes fecales, que son aquellos coliformes que fermentan la lactosa a 44°C y, concretamente, en el análisis de *E. coli*, el coliforme fecal por excelencia y biotipo principal de *Escherichia*.

E. coli es una bacteria que cuenta con una serie de características, añadidas a las comunes de bacterias coliformes, que son clave para su estudio, detección y cuantificación: tiene una morfología de bacilo recto asporógeno, cuenta con flagelos peritricos que pueden ser tanto



móviles como inmóviles. Son microorganismos de crecimiento aerobio y facultativamente anaerobio, reducen los nitratos a nitritos y son catalasa-positivos (Bell y Kyriades, 2000). Además, expresan β -D-galactosidasa y β -D-glucuronidasa, enzimas determinantes en el método de recuento empleado en este estudio (ISO 9308-2:2012).

Escherichia coli es habitualmente un representante inofensivo de la microflora comensal de la porción distal del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente (Bell y Kyriades, 2000). En humanos, a partir del íleo, la concentración de esta microbiota va aumentando, alcanzando en el colon una concentración de 10^{10} - 10^{11} ufc/g. Se estima que existen, al menos, de 500 a 1000 especies microbiológicas distintas que conforman la flora intestinal humana, no obstante se ha determinado que a nivel cuantitativo predominan de 10 a 20 géneros (tabla 3) entre los que se encuentran tanto *E. coli* como los géneros englobados por coliformes totales (Cabral, 2010).

Tabla 3. Recuento de microorganismos viables en heces humanas pertenecientes a niños, adultos y ancianos en buen estado de salud. Fuente: Cabral, 2010.

Grupo microbiano	Log ₁₀ UFC/g de heces	Grupo microbiano	Log ₁₀ UFC/g de heces
<i>Bacteroides</i>	11,3	<i>Actinomyces</i>	9,2
<i>Eubacterium</i>	10,7	<i>Methanobrevibacter</i>	8,8
<i>Bifidobacterium</i>	10,2	<i>Desulphovibrio</i>	8,4
<i>Ruminococcus</i>	10,2	<i>Fusobacterium</i>	8,4
<i>Pptostreptococcus</i>	10,1	<i>Enterococci</i>	3,5 - 7,2
<i>Peptococcus</i>	10,0	<i>Enterobacteriaceae</i>	5,9 - 8,0
<i>Clostridium</i>	9,8	<i>Escherichia Coli</i>	7,5 - 7,7
<i>Lactobacillus</i>	9,6	<i>Citrobacter</i>	3,3
<i>Propionobacterium</i>	9,4	<i>Klebsiella</i>	2,4

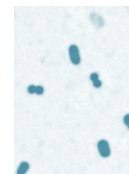
La presencia de *E. coli* en aguas de consumo humano es factor indicativo de contaminación fecal reciente debida a actividad animal y/o humana en ambientes externos. Esta contaminación también puede deberse a un tratamiento inadecuado de eliminación de bacterias fecales y/o de alteraciones en la integridad de sistemas de distribución hídrica (Campos, 2001).

1.3.2. Enfermedades asociadas

Aunque la mayor parte de cepas de *E. coli* no son patógenas, la especie cepas (EPEC, ETEC, EHEC, etc.) que son capaces de causar varios tipos de enfermedad que pueden llegar a ser mortales si el paciente no es tratado correctamente (Bell y Kyriades, 2000). La infección por *E. coli* produce un cuadro sintomatológico diverso que comienza a manifestarse de 24 a 72 horas después de haber consumido el agua contaminada. El síntoma más común es la diarrea súbita, no obstante, el individuo infectado también puede padecer fiebre, inapetencia, gases, cólicos estomacales, vómitos e, incluso, infección urinaria. Una infección por *Citrobacter* patógena también produce alteraciones a nivel de colon e intestinal, mientras que determinadas cepas de *Klebsiella* son potenciales de producir enfermedades respiratorias (OMS, 2008).

1.3.3. Métodos de ensayo para la detección de bacterias indicadoras de contaminación fecal

Tanto las distintas condiciones ambientales como las diversas naturalezas de las muestras que se analizan influyen en el proceso de recuento, hecho que da lugar a variabilidad en el análisis microbiológico. Por este motivo existen métodos y procedimientos de laboratorio



normalizados —exámenes sistemáticos— para poder establecer uniformidad en los criterios de calidad microbiológica a niveles interlaboratorio nacionales e internacionales. Cuando se procede a adoptar un método internacional en un laboratorio éste debe ser sometido, previamente, a evaluación atendiendo a la situación local (Köster *et al.*, 2003).

En el LSPV se han empleado métodos normalizados establecidos por la ISO para la detección de coliformes totales y de *E. coli* (tabla 4). A continuación realizamos una breve descripción de estos métodos de ensayo, señalando en qué se fundamentan y las ventajas y desventajas que aportan cada uno de ellos.

Tabla 4. Métodos estandarizados para la detección y recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* por (A) NMP por diluciones —tubo múltiple— y (B) filtración en membrana. Fuente: Köster *et al.*, 2003.

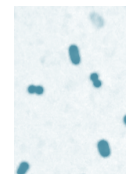
(A)	9308-2:1990	Detección y recuento de microorganismos coliformes, microorganismos coliformes termotolerantes y <i>Escherichia coli</i> . Método del tubo múltiple (número más probable).
(B)	UNE-EN ISO 9308-1:2001	Detección y recuento de <i>Escherichia Coli</i> y de bacterias coliformes. Método de filtración en membrana.

1.3.3.1. NMP —Método del tubo múltiple

Este método se fundamenta en la capacidad de las bacterias coliformes de fermentar lactosa con producción de ácido y gas cuando son cultivadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h, en él, volúmenes decrecientes de muestra —diluciones decimales consecutivas— son inoculadas en un medio de cultivo adecuado. Este método consta de tres etapas que deben complementarse para el análisis rutinario de aguas de consumo humano (Vargas, 1983) (ISO 9308-2:1990):

- a. Fase presuntiva: en esta fase se cultivan volúmenes determinados de muestra en tubos con caldo lauril triptosa y son incubados en las condiciones necesarias para que la actividad metabólica de las bacterias se estimule y ocurra una selección inicial de organismos que fermenten la lactosa con producción de gas. La formación de gas supone una prueba presuntiva positiva para la presencia de coliformes totales.
- b. Fase confirmativa: se transfieren todos los tubos positivos de la prueba presuntiva a tubos que contienen caldo lactosado verde brillante, volviendo a ser incubados en las condiciones descritas previamente. El caldo empleado en esta fase es un medio selectivo que solo permite el desarrollo de los microorganismos diana, reduciendo la posibilidad de falsos positivos. La producción de gas después de la incubación constituye una prueba positiva.
- c. Fase complementaria: La búsqueda de *E. coli* se realiza por siembra en medios selectivos y diferenciales como Agar MacConkey o Agar eosina azul de metileno y, posteriormente, se confirman las colonias típicas.

Para que la precisión de este método sea adecuada deben emplearse numerosas réplicas. Normalmente se requiere cultivar de nuevo ciertas colonias para llevar a cabo confirmaciones, lo que incrementa el coste y el tiempo del proceso. Cuando la selectividad del medio no es adecuada, los coliformes totales y *E. coli* pueden quedar enmascarados por el crecimiento de otros microorganismos y, además, la propia muestra puede contener inhibidores de crecimiento de dichos microorganismo diana (Köster *et al.*, 2003).



1.3.3.2. Método de filtración de membrana

El principio de este método se basa en la determinación del número de microorganismos presentes en un volumen establecido de agua mediante la técnica de filtración en membrana con bomba de vacío. Dichas membranas son cultivadas e incubadas en un medio de cultivo cromogénico diferencial —ACC— adicionado con vancomicina y cefsulodina, que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas, *Pseudomonas* y *Aeromonas* respectivamente.

Para coliformes totales las colonias características en el medio utilizado, tras su incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, son de color rosa asalmonado a rojo por su actividad β -galactosidasa. En el caso de *Escherichia coli*, dichas colonias presentarán un color de azul oscuro a violeta por la actividad de los enzimas β -galactosidasa y β -glucuronidasa. De esta forma contaremos las colonias de color rosa a rojo y de azul a violeta para el recuento de coliformes totales y únicamente estas últimas para el recuento de *Escherichia coli* (PI, 2015) (UNE-EN ISO 9308-1:2001).

Este método presenta determinadas desventajas debido a que las partículas en suspensión y las sustancias químicas insolubles presentes en la muestra también quedan retenidas en la membrana durante la filtración, interfiriendo en el crecimiento de los microorganismos diana. Por estos motivos no es un buen método cuando las muestras presentan turbidez. Además, no siempre es sencillo determinar qué colonias son típicas de coliformes totales y *Escherichia coli* (Köster *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

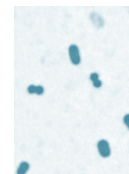
Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objeto el estudio del recuento de microorganismos indicadores de contaminación fecal —coliformes totales y *Escherichia coli*— en aguas de consumo humano por el método del NMP según la norma ISO 9308-2:2012 basado en la Tecnología de Sustrato Definido y el sistema *Quanti-Tray*.

El trabajo se ha centrado en la descripción del método de recuento por NMP de dilución única y la validación del mismo, y ha sido realizado en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia (Dirección General de Salud Pública). Además, recoge los resultados obtenidos a partir de la aplicación del método para el análisis de muestras de aguas de consumo humano durante 8 meses a lo largo del año 2015 y principios de 2016 en dicho laboratorio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipos y Materiales

- Estufa de cultivo regulable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Mechero gas.
- Cabina de flujo laminar horizontal.
- Pipetas automáticas de volumen variable.
- Frascos de plástico estériles de 110 ml de capacidad.
- Probetas de 100ml de capacidad.
- Bolsas *Quanti-Tray* (figura 2, A).
- Bandeja 51: molde de goma para introducir la bolsa en la selladora (figura 2, B).
- Selladora 2X: para el sellado y distribución del contenido de la bolsa *Quanti-Tray* en los pocillos.
- Termómetro: control de la temperatura de la sala de siembras de agua.



- Lámpara ultravioleta de 365 nm.
- Cepas de referencia.

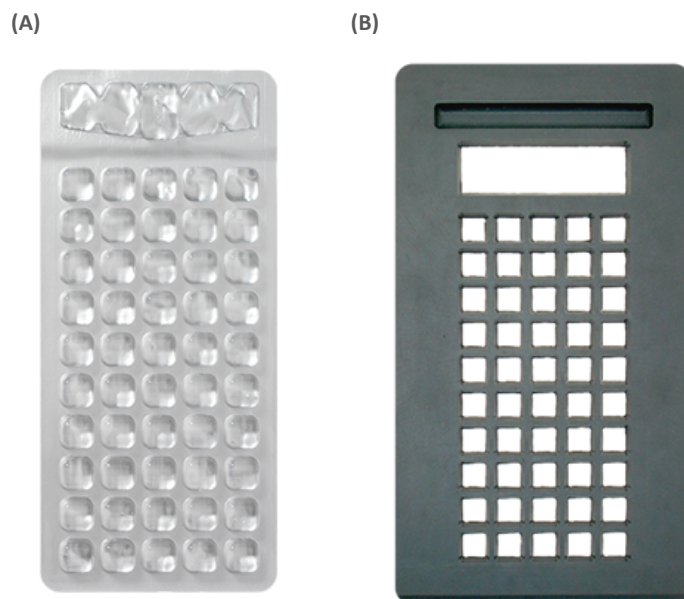


Figura 2. (A) Bolsa *Quanti-Tray*, (B) bandeja 51 pocillos. Fuente: Laboratorios IDEXX.

3.2. Reactivos y Medios de Cultivo

- Agua desionizada estéril (ADE): para realizar el control negativo del proceso.

Los medios de cultivo son adquiridos comercialmente y deben almacenarse, alejados de la luz, a una temperatura de entre 2 y 25°C:

- *Colilert-18*: caja con 100 envases que contienen medio de cultivo en polvo. Cada cápsula contiene 2,8 g de medio, cantidad necesaria para emplear en 100 ml de muestra.
- *Colilert-18 Quanti-Tray Comparator*: bolsa control con pocillos de color amarillo para distinguir por comparación resultados positivos y negativos.

3.3. NMP —Método de dilución única

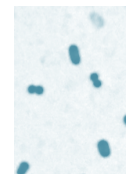
3.3.1. Fundamento

Este método es una prueba diseñada específicamente para el recuento NMP de bacterias coliformes (indicadores de contaminación fecal) a partir de muestras de agua y es aplicable a todo tipo de aguas destinadas al consumo humano (ISO 9308-2:2012).

La técnica *Colilert-18* se basa en la Tecnología de Sustrato Definido —*Defined Substrate Technology*— patentada por la empresa IDEXX, que permite detectar de forma simultánea coliformes totales y *E. coli*.

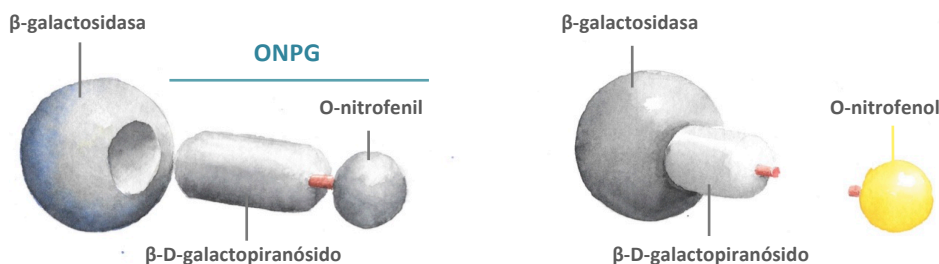
El método *DST* emplea nutrientes indicadores, es decir, reactivos que provocan cambios de coloración en las muestras de agua sometidas a estudio:

- a. Coliformes totales: metabolizan el sustrato cromogénico ONPG (ortonitrofenol- β -D-galactopiranosido) gracias a la actividad de su enzima β -galactosidasa; la escisión del o-nitrofenol provoca un paso de coloración de transparente a amarillo (figura 3, A).
- b. *Escherichia coli*: estas bacterias también tienen capacidad de metabolizar ONPG y, además, metabolizan específicamente el sustrato fluorogénico MUG (4-metil-umbelliferil-



β -D-glucurónico), su enzima β -glucuronidasa provoca la ruptura del enlace que libera a la molécula de 4-metil-umbelliferona, responsable de producir fluorescencia (figura 3, B). No obstante, algunas cepas de *E. coli* son β -glucuronidasa negativo (como *E. coli* O157), siendo detectadas como coliformes totales (Köster *et al.*, 2003).

(A) Coliforme



(B) *Escherichia coli*

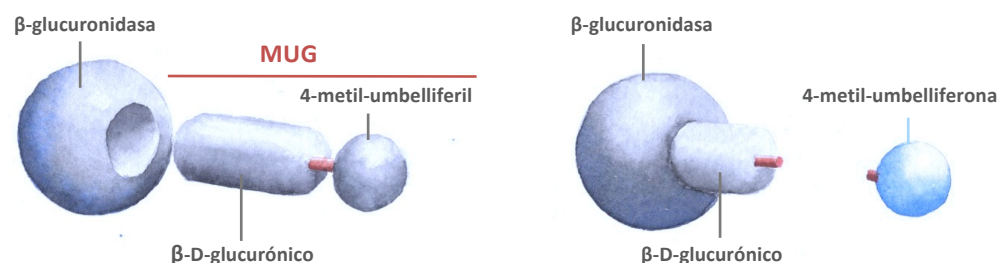


Figura 3. (A) Metabolización de ONPG por el enzima β -galactosidasa en bacterias coliformes y (B) metabolización de MUG por el enzima β -glucuronidasa en *Escherichia coli*. Fuente: Laboratorios IDEXX.

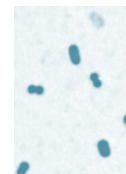
3.3.2. Procedimiento experimental

La siguiente metodología se emplea en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia desde marzo de 2015 para el análisis de aguas de consumo humano, y queda recogida en un procedimiento interno de ensayo (PI-C, 2014). Para el desarrollo de este procedimiento y su aplicabilidad en el análisis de muestras para controles de calidad fue necesario llevar a cabo una validación del método normalizado ISO 9308:2012, que aprueba la metodología desarrollada por Laboratorios IDEXX.

3.3.2.1. Preparación

Previamente a la realización del análisis debemos (UNE-EN ISO 7218:2008):

- Evitar corrientes de aire en la sala de trabajo.
- Comprobar que la temperatura ambiente de la sala está comprendida entre los 17 - 28°C.
- Rotular cada frasco y cada bolsa *Quanti-Tray* con el número de registro de la muestra. Este paso es de elevada importancia pues evita posibles confusiones debidas a la sistemática de trabajo.
- Homogeneizar la muestra por agitación vigorosa para lograr una distribución uniforme de los microorganismos en el agua.



3.3.2.2. Realización

A continuación se describen los pasos —muchos de ellos esquematizados en la figura 4— que deben seguirse para la realización del análisis experimental:

1. Poner en el frasco de plástico estéril 100 ml de la muestra a analizar. Como en las aguas de consumo humano no esperamos un recuento elevado de estas bacterias, no es necesario realizar ningún tipo de dilución.
2. Abrir una cápsula de *Colilert-18* y añadir su contenido en el frasco.
3. Agitar la mezcla por inversión para lograr disolver el medio de cultivo. En la mayoría de los casos es necesario esperar unos pocos minutos hasta la completa disolución del mismo.
4. Sostener con una mano la bolsa *Quanti-Tray* con la parte de la abertura orientada hacia arriba y el lado de las celdas orientado hacia la palma de la mano que sujeta el dispositivo. Apretar la parte de arriba de la bolsa, tirando de la lengüeta metálica para abrirla. Es muy importante mantener la asepsia, de forma que evitaremos tocar el interior de dicha lengüeta o del propio dispositivo.
5. Depositar el contenido del frasco en el dispositivo *Quanti-Tray*.
6. Colocar la bolsa en el molde de goma correspondiente para introducirlo en el sellador con el lado de las celdillas orientado hacia abajo. El sellador debe estar encendido desde el comienzo del proceso dado que necesita tiempo para calentarse y solo podremos introducir las muestras cuando la máquina lo indique con una luz verde.
7. Una vez la bolsa está sellada, llevar a incubación en estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 - 22 horas. Es importante anotar en la bolsa la hora del comienzo de la incubación para leer los resultados en el periodo de tiempo adecuado y así evitar tomar datos erróneos.

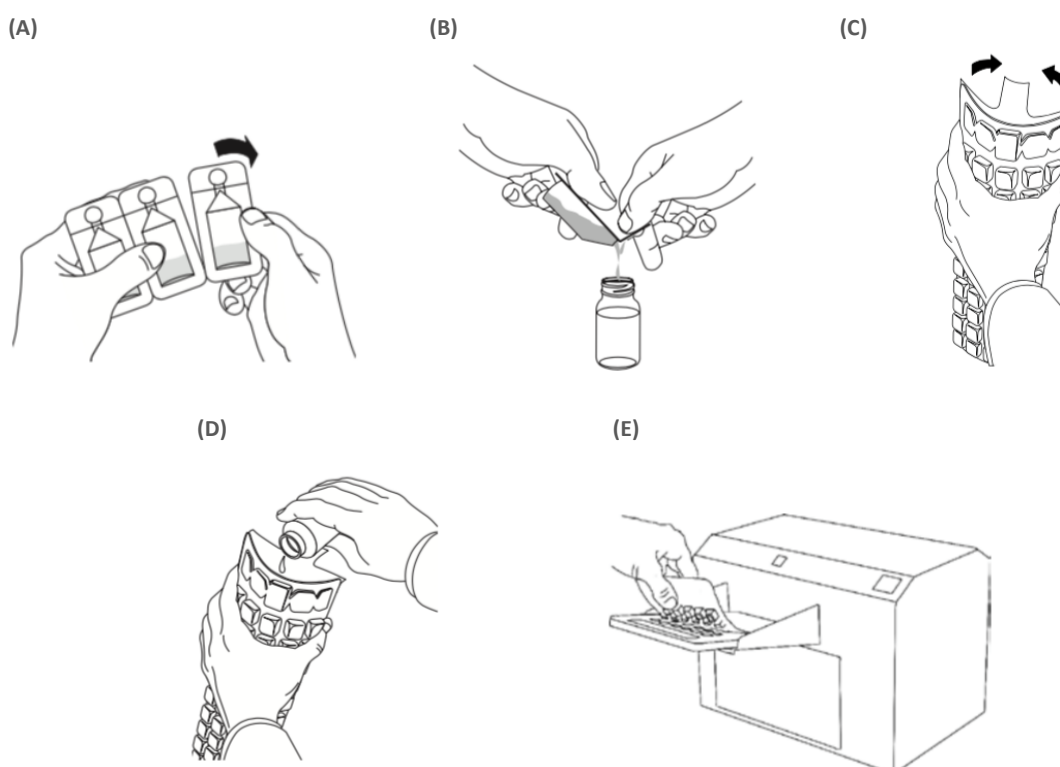
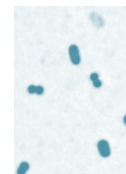


Figura 4. Realización del procedimiento experimental del método NMP de dilución única: (A) y (B) paso 2, (C) paso 4, (D) paso 5 y (E) paso 6. Fuente: Laboratorios IDEXX.



3.3.3. Recuento

Durante el proceso de recuento se determina el número de celdas positivas para coliformes totales y el número de celdas positivas para *E. coli*. Los datos obtenidos son tratados posteriormente para determinar con exactitud la cantidad de bacterias presente en la muestra y, en consecuencia, determinar la contaminación de origen fecal en las aguas analizadas.

En primer lugar en el recuento de coliformes se consideran celdas positivas aquellas cuyo contenido ha virado a amarillo tras el periodo de incubación. En caso de que la intensidad del amarillo genere dudas conviene comparar la muestra con la bolsa *Quanti-Tray* de referencia.

A continuación se procede a buscar fluorescencia en las celdas que han cambiado su coloración a amarillo para el recuento de *Escherichia coli* en la muestra. Para ello se emplea una lámpara de luz UV —de 6 vatios y 365 nm—, colocando la bolsa *Quanti-Tray* a una distancia aproximada de 13 cm de la misma (ISO 9308-2:2012). Es conveniente realizar este paso en un ambiente oscuro para determinar con precisión cuántos pocillos emiten fluorescencia.

Hay que contar todos los pocillos positivos para coliformes totales y para *E. coli* (figura 5) y anotar el resultado obtenido para cada grupo bacteriano en la correspondiente ficha de trabajo del laboratorio (F0009; anexo I, apartado B).

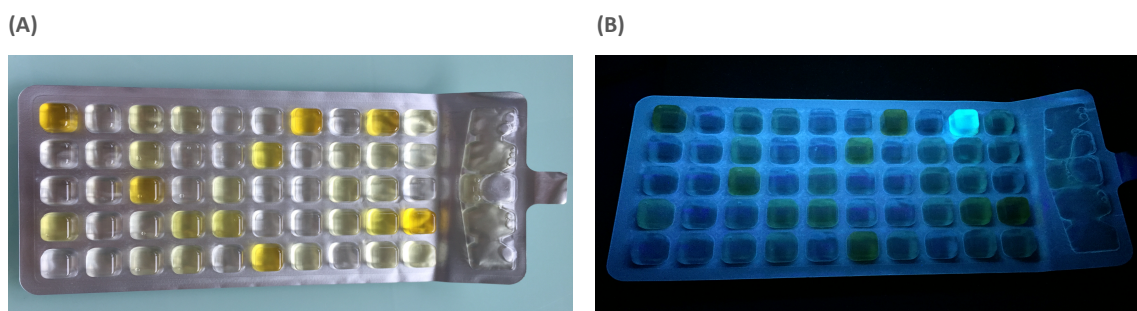


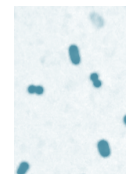
Figura 5. Bolsa *Quanti-Tray* con 18 pocillos positivos para coliformes totales (A) y un pocillo positivo para *E. coli* (B).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fundamentos del proceso de Validación

La Unidad de Microbiología del LSPV, como laboratorio de diagnóstico microbiológico, requiere de unas metodologías eficaces ya que realiza continuos y numerosos controles analíticos. Además, las respuestas analíticas a dichos controles deben ser rápidas debido a la elevada capacidad de determinados microorganismos de producir brotes infecciosos (Tomás *et al.*, 2007).

La Entidad Nacional de Acreditación, organismo que acredita todos los métodos analíticos de Salud Pública, afirma que “el desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una repercusión decisiva en el ámbito de la salud pública” (ENAC, 2015). Por este motivo los laboratorios deben disponer de procedimientos de control de calidad, para comprobar la validez de los ensayos que llevan a cabo. Esto se logra implantando un Sistema de Gestión de Calidad que asegure el seguimiento de medidas fundamentales como son los registros de datos primarios y de resultados analíticos de las muestras, que son necesarios para mantener la trazabilidad y poder detectar y evitar errores debidos a determinadas condiciones bajo las que se llevan a cabo los análisis. Gracias a este sistema se



garantiza que toda la información obtenida de los resultados de los procedimientos analíticos va a ser correcta y de confianza, de forma que se puedan calificar como adecuados, reproducibles y seguros los métodos de ensayo empleados en el laboratorio (Tomás *et al.*, 2007). En consecuencia, la forma más eficaz para conseguir las garantías previamente citadas será el empleo de métodos normalizados, métodos de referencia o métodos alternativos aceptados (Camaró *et al.*, 2013).

El método de ensayo tratado en el presente estudio fue validado en el LSPV siendo un método normalizado de referencia desarrollado por la Organización Internacional de Estándares en el año 2012 (ISO 9308-2:2012). Este tipo de métodos puede emplearse para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación y, además, solo requiere de una confirmación que determine su correcta aplicación (Camaró *et al.*, 2013).

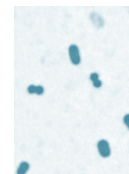
En este caso concreto, al tratarse de un método normalizado de naturaleza cuantitativa, dicha confirmación requiere de la verificación del cumplimiento de determinados requisitos asociados a la recuperación, evaluada a partir de valores de referencia, y a la reproducibilidad (ENAC, 2015).

La ISO 9000:2000 define la validación de un método de ensayo como “el proceso de evaluación de las características de un procedimiento de medida y comprobación de que dichas características cumplen una serie de requisitos preestablecidos para el uso específico previsto”. La validación se aplica exclusivamente a procedimientos, y permite generar evidencias documentadas.

4.2. Flujo general de validación de un método de ensayo

El proceso de validación lleva asignada una serie de tareas que se citan a continuación (PI-B, 2014):

- i. Planificación: consiste en la asignación de responsables y el establecimiento de las características y requisitos.
- ii. Diseño experimental: permite el desarrollo de la sistemática de validación.
- iii. Desarrollo experimental: consiste en la aplicación del diseño experimental a las muestras. Los datos obtenidos deben recogerse en fichas de trabajo. Muchas veces es necesario el desarrollo de hojas de cálculo para agilizar la obtención de resultados.
- iv. Evaluación de los resultados: debe comprobarse que cumplen con los requisitos establecidos para la validación. Incluye una declaración final de evaluación de la validación del método.
- v. Emisión de un informe de validación que debe contar con los siguientes apartados correctamente cumplimentados:
 - Método a validar.
 - Responsable de la validación.
 - Objetivos y uso previsto de dicho método.
 - Parámetros y requisitos.
 - Sistemática de validación.
 - Registro de experimentos. Este apartado debe incluir la fecha de realización, las fichas de trabajo y el personal que ha llevado a cabo dichos experimentos.
 - Datos adicionales.
 - Hoja de cálculo.
 - Valores obtenidos y decisión.
 - Declaración final del proceso de validación.



4.3. Controles para el aseguramiento de la calidad

Con el fin de asegurar que se siguen cumpliendo los requisitos exigidos en la validación, tanto para la exactitud como para la precisión, deben realizarse controles internos y controles externos en el laboratorio de forma periódica (ENAC, 2015).

4.3.1. Control interno

El control de calidad interno consiste en la verificación periódica, por parte del laboratorio, del cumplimiento de los parámetros documentados en el informe de validación del ensayo. Para ello se establece una sistemática de actuación que permite demostrar que la variabilidad entre técnicos, equipos y materiales está bajo control. Este control abarca todos los ensayos incluidos en el alcance de acreditación (PI, 2013).

Para los ensayos cuantitativos los controles que se realizan son para (i) la exactitud y (ii) la precisión (ENAC, 2015):

i. El control de la exactitud consiste en:

- Inoculación artificial de muestras negativas con el microorganismo diana.
- Siembra del inóculo en TSA para obtener el valor de referencia.
- Aplicación del procedimiento interno.
- Cálculo de la recuperación.
- Registros de los resultados obtenidos.
- Realización con una periodicidad mensual.

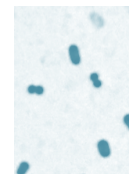
ii. Por otro lado, el control de la precisión se lleva a cabo siguiendo estos pasos:

- Realización de duplicados en condiciones de reproducibilidad.
- Representación de la diferencia de los valores obtenidos en log (rango) en los gráficos de control.
- Registros de los resultados obtenidos.
- Realización en cada serie de trabajo.
- Además, en cada serie de trabajo se realizará un control negativo del proceso que consistirá en el examen de un blanco —ADE— que se analizará como si fuera una de las muestras y quedará registrado en las fichas de trabajo correspondientes como CNP (PI, 2013).

4.3.2. Control externo

Este tipo de control de calidad se realiza participando en ejercicios interlaboratorio (PI-C, 2014), en nuestro caso, con determinaciones para el recuento de coliformes totales y *E. coli* en aguas de consumo humano por NMP. La participación en estas intercomparaciones permite una evaluación del estado de la técnica empleada en el laboratorio, de esta forma puede demostrarse que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por las normas y reglamentos vigentes (ENAC, 2015).

En el caso de que la evaluación de alguno de estos ejercicios diera un resultado no satisfactorio o cuestionable se abriría un informe de no conformidad donde constarían las acciones correctoras a aplicar (PI-C, 2014).



4.4. Validación del método de recuento por NMP

Este apartado se centra en la descripción de la validación del método de recuento de coliformes totales y *E. coli* en aguas de consumo humano por el método del número más probable de dilución única. Dado que el método empleado para este recuento es un método normalizado (ISO 9308-2:2012), la validación que se realiza será una verificación de los parámetros de recuperación como una medida de la exactitud, y la reproducibilidad como una medida de la precisión.

Se trata de un método cuantitativo, en el que el número de microorganismos en una cantidad de muestra determinada se obtiene mediante el uso de unas tablas estadísticas, dicho valor está incluido en un intervalo de confianza.

En nuestro caso, definiremos la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de una medición obtenida a partir del método NMP y el valor de referencia aceptado, teniendo en cuenta siempre el resultado obtenido por el análisis de un blanco (Camaró *et al.*, 2013).

Por otro lado, definiremos el término precisión como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de cada par de valores al aplicar el procedimiento analítico tratado en este estudio bajo condiciones de reproducibilidad (Camaró *et al.*, 2013). El cálculo de este parámetro debe realizarse en muestras con diferentes niveles de contaminación (ENAC, 2015). Esta medida nos permitirá evaluar el grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición (Camaró *et al.*, 2013).

La sistemática de validación empleada para el método de ensayo de recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* por NMP en aguas de consumo humano sigue el esquema representado en la figura 6.

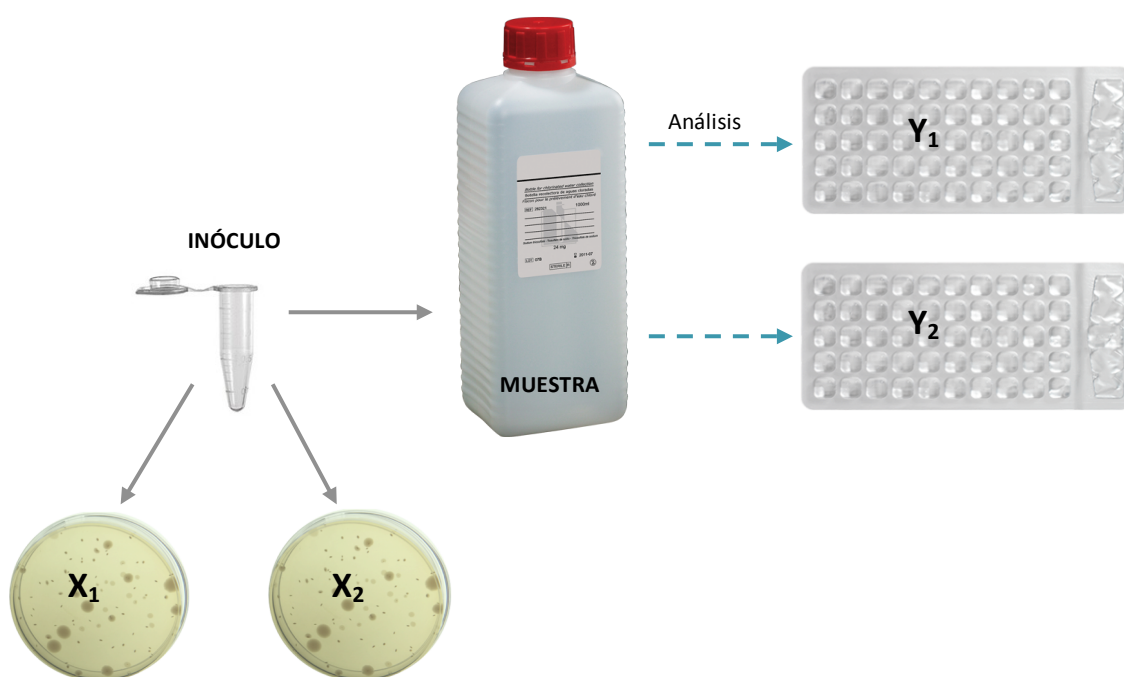
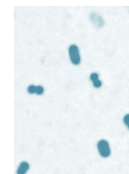


Figura 6. Diagrama de la sistemática seguida para la validación del método.

Los pasos que se siguieron para llevar a cabo dicha validación se explican en el siguiente apartado.



4.4.1. Preparación de las muestras

Se seleccionaron 30 muestras de aguas de consumo humano que llegaron al Laboratorio de Salud Pública de Valencia para su análisis ordinario. Estas aguas provenían de distintos orígenes para que la validación fuera representativa (figura 7).

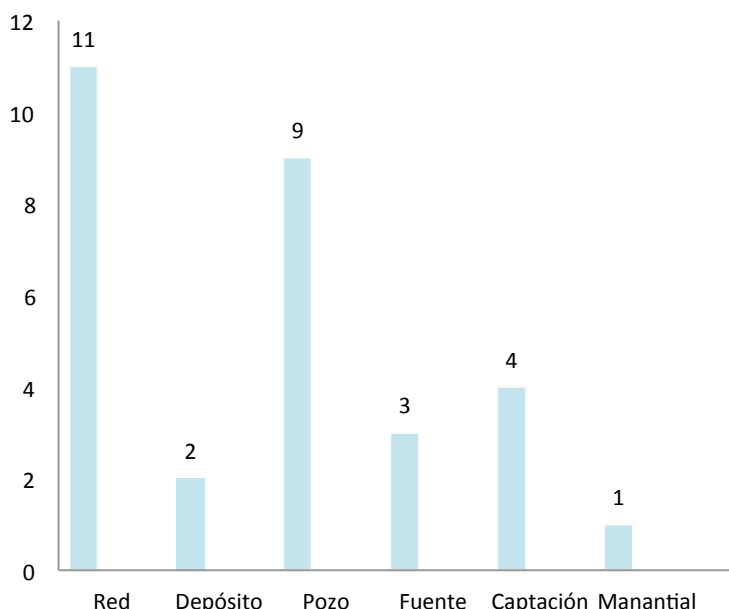


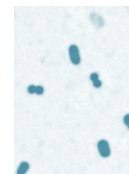
Figura 7. Gráfico de columnas que representa (eje x) el origen y (eje y) la cantidad de muestras de agua de consumo humano empleadas para la validación del método de ensayo. Fuente: datos sistema LIMS.

De cada muestra se prepararon 3 alícuotas de 100 ml cada una. La primera alícuota se empleó para la realización del blanco y las otras dos para ser inoculadas y procesadas en condiciones de reproducibilidad, es decir, muestras analizadas por distintos analistas, con diferentes lotes de medios y equipos distintos. Durante la validación buscamos las condiciones de análisis de muestras más desfavorables y/o dispares que puedan afrontarse, de esta forma cuando se aplique el método ordinariamente se obtendrán unos datos correctos y fiables.

4.4.2. Preparación del inóculo

Para la obtención del valor de referencia existen distintas posibilidades (Camaró *et al.*, 2013):

- i. Utilización de un método de referencia sobre muestras naturales o contaminadas artificialmente: hace referencia a un método validado con una exactitud y precisión adecuadas, puede utilizarse para evaluar otros métodos por comparación de resultados.
- ii. Utilización de cepas de trabajo procedentes de colecciones de cultivo tipo. Las cepas de trabajo son cultivos de microorganismos obtenidos de un único subcultivo de cepas de reserva, se obtienen para ser utilizadas en el día a día (una cepa de reserva es un cultivo de referencia mantenido por un laboratorio y obtenido a partir de un único subcultivo de la cepa de referencia, esta última consiste en un cultivo de microorganismos obtenido de una colección nacional o internacional reconocida).
- iii. Utilización de material de referencia acompañado de un certificado en el que constan condiciones de almacenamiento y uso, número de unidades formadoras de colonias, intervalo de confianza o incertidumbre y método empleado.
- iv. Utilización de información procedente de ejercicios intercomparación.



En nuestro caso obtuvimos los valores de referencia a partir de (ii) cepas de trabajo procedentes de cepas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), que se conservan en el LSPV en congelación a $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Las cepas diana utilizadas para la validación fueron (a) *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii* para coliformes totales y, únicamente, (b) *E. coli* para *Escherichia coli*.

Para la preparación del inóculo se descongelan los viales que contienen las suspensiones de las cepas de trabajo diana, y se preparan en agua de peptona al 0,1% estéril las diluciones necesarias para alcanzar la concentración adecuada para inocular la muestra.

Los inóculos preparados se valoran por duplicado, sembrando en profundidad 1 ml de los mismos en medio de cultivo TSA, que se incuba a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Una vez pasado este periodo de incubación se procede al recuento de las colonias con el fin de ir obteniendo los distintos valores de referencia para *E. coli* y coliformes totales en el proceso de validación. Para realizar estos recuentos se observan las placas bajo lupa con una fuente inferior de luz para así distinguir las colonias con mayor claridad (figura 8).

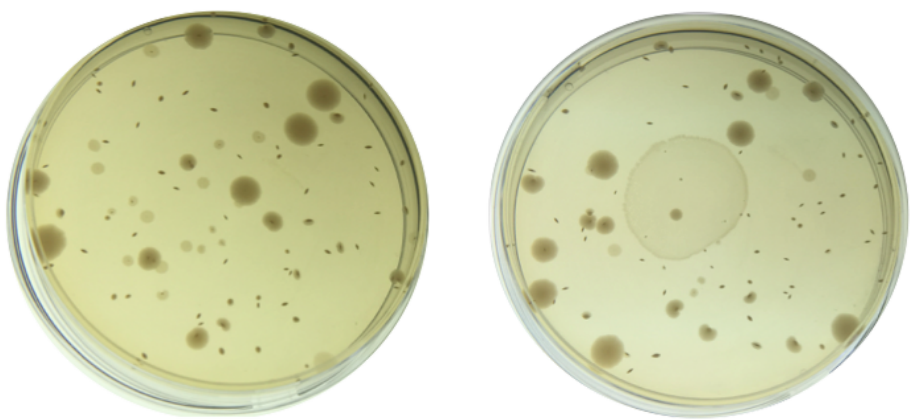
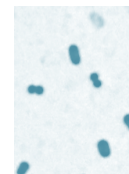


Figura 8. Placas de TSA con colonias de *Escherichia coli* bajo lupa con fuente inferior de luz.

Las concentraciones en ufc/ml de los inóculos tanto de *Escherichia coli* como de coliformes totales se recogen en la tabla 5. Estos recuentos en TSA fueron obtenidos a partir de los 12 inóculos que empleados en la validación. Este proceso se realizó 6 días, de forma que se prepararon dos inóculos diariamente (uno para cada cepa diana).

Tabla 5. Valores medios de los recuentos de colonias de *E. coli*, *Citrobacter freundii* y coliformes totales los días de realización de análisis para la validación. Fuente: Hoja de cálculo G0903, anexo II.

FECHA	<i>Escherichia coli</i> ufc/ml	<i>Citrobacter freundii</i> ufc/ml	Coliformes totales
Día 1	20.5	40	60,5
Día 2	78	39	117
Día 3	55	81,5	136,5
Día 4	34	7,5	41,5
Día 5	31	24.5	55,5
Día 6	18.5	27	45,5



4.4.3. Inoculación y análisis de las muestras

Cada día que se procesaron muestras para validar el método, se inocularon dos alícuotas de cada muestra de agua con los inóculos de las cepas diana de la siguiente manera:

- i. Para la validación del método para CT se inoculó 1 ml de *E. coli* y 1 ml de *C. freundii*.
- ii. Para la validación del método para EC se inoculó 1 ml de *E. coli*.

Todas estas muestras se procesaron, en condiciones de reproducibilidad desde su inicio, aplicando el procedimiento explicado en el punto 3.3.2. del apartado correspondiente a Metodología, y se fueron obteniendo los distintos valores de recuento de coliformes totales y *E. coli*.

4.4.4. Recogida de datos

Durante los análisis de las aguas deben anotarse los datos primarios, el volumen de muestra filtrado, los equipos utilizados, los técnicos implicados, etc. Tanto estos datos como los resultados obtenidos del análisis de aguas son recogidos en las fichas de trabajo desarrolladas en el LSPV (fichas F0007 y F0009 respectivamente; anexo I, apartados A y B). El registro de los datos es fundamental para asegurar la trazabilidad durante el proceso y para poder detectar, en su caso, posibles errores.

4.5. Tratamiento de los datos

Los valores de los parámetros de validación para los ensayos cuantitativos por NMP en el LSPV correspondientes a las muestras se obtienen empleando la hoja de cálculo G0903 (anexo II).

A continuación procedemos a explicar cómo se han obtenido los requisitos, es decir, los valores de los parámetros de exactitud y precisión que deben cumplirse para la validación del método.

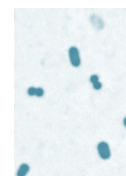
4.5.1. Requisitos —Exactitud y Precisión

Para evaluar la exactitud del método se emplea el criterio de Puntuación HPA establecido para los ejercicios de intercomparación por la Agencia de Protección de Salud Británica (*Health Protection Agency*), entidad encargada de desarrollar estándares para investigación microbiológica tanto para uso clínico como para profesionales de salud pública (HPA, 2011). A partir del año 2013 esta agencia entró a formar parte de la entidad de salud británica *Public Health England*, encargada en la actualidad de desarrollar y supervisar estos estándares (PHE, 2014). Se seleccionó este criterio puesto que a nivel nacional no existe ningún estándar referente al método tratado en la presente validación.

Para el cálculo de esta puntuación a cada valor HPA obtenido durante el análisis de las aguas de consumo humano se le debe asignar una puntuación atendiendo al rango en el que se encuentre el valor obtenido para cada muestra (tabla 6).

Tabla 6. Rango de valores HPA asociado a cada puntuación. Fuente: HPA, 2011.

HPA	PUNTUACIÓN HPA
<2,68	3
2,68 a 4	2
>4	0



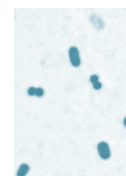
La puntuación final para la exactitud en la validación será la suma de las puntuaciones parcialmente obtenidas de cada muestra.

El requisito que debe cumplirse para este parámetro es una Puntuación final HPA mayor o igual al 90% de la puntuación máxima posible que se pueda alcanzar con un cierto número de determinaciones (HPA, 2011). Como hay 30 muestras y la máxima puntuación para cada muestra es de 3, la puntuación más elevada que puede obtenerse es 90, y el 90% de dicha puntuación es 81. En definitiva, el requisito que debe cumplir el parámetro de exactitud es obtener una Puntuación total HPA igual o mayor a 81.

Por otro lado, el requisito del parámetro de precisión para la validación viene dado por la S_R de referencia. El valor de dicho requisito se extrae de la tabla 7, tabla estadística del NMP específica para muestras analizadas con dispositivos *Quanti-Tray* (IDEXX, 2015), concretamente se obtiene a partir los límites de confianza de dicha tabla.

Tabla 7. Tabla estadística del método NMP para recuentos en muestras analizadas con *Colilert-18* y dispositivos *Quanti-Tray*.

POCILLOS +	NMP	LI	LS	U	U ²
1	1,0	0,3	5,6	0,324	0,105
2	2,0	0,6	7,3	0,277	0,077
3	3,1	1,1	9	0,233	0,054
4	4,2	1,7	10,7	0,204	0,042
5	5,3	2,3	12,3	0,186	0,035
6	6,4	3,0	13,9	0,170	0,029
7	7,5	3,7	15,5	0,159	0,025
8	8,7	4,5	17,1	0,148	0,022
9	9,9	5,3	18,8	0,140	0,020
10	11,1	6,1	20,5	0,134	0,018
11	12,4	7	22,1	0,127	0,016
12	13,7	7,9	23,9	0,123	0,015
13	15,0	8,8	25,7	0,119	0,014
14	16,4	9,8	27,5	0,114	0,013
15	17,8	10,8	29,4	0,111	0,012
16	19,2	11,9	31,3	0,107	0,011
17	20,7	13	33,3	0,104	0,011
18	22,2	14,1	35,2	0,101	0,010
19	23,8	15,3	37,3	0,099	0,010
20	25,4	16,5	39,4	0,096	0,009
21	27,1	17,7	41,6	0,095	0,009
22	28,8	19	43,9	0,093	0,009
23	30,6	20,4	46,3	0,091	0,008
24	32,4	21,8	48,7	0,089	0,008
25	34,4	23,3	51,2	0,087	0,008
26	36,4	24,7	53,9	0,086	0,007
27	38,4	26,4	56,6	0,084	0,007
28	40,6	28	59,5	0,084	0,007



29	42,9	29,7	62,5	0,082	0,007
30	45,3	31,5	65,6	0,081	0,007
31	47,7	33,4	69	0,080	0,006
32	50,4	35,4	72,5	0,079	0,006
33	53,1	37,5	76,2	0,079	0,006
34	56,0	39,7	80,1	0,078	0,006
35	59,1	42	84,4	0,077	0,006
36	62,4	44,6	88,8	0,076	0,006
37	65,9	47,2	93,7	0,076	0,006
38	69,7	50	99	0,076	0,006
39	73,8	53,1	104,8	0,075	0,006
40	78,2	56,4	111,2	0,075	0,006
41	83,1	59,9	118,3	0,075	0,006
42	88,5	63,9	126,2	0,075	0,006
43	94,5	68,2	135,4	0,076	0,006
44	101,3	73,1	146	0,077	0,006
45	109,1	78,6	158,7	0,078	0,006
46	118,4	85	174,5	0,080	0,006
47	129,8	92,7	195	0,082	0,007
48	144,5	102,3	224,1	0,087	0,008
49	165,2	115,2	272,2	0,095	0,009
50	200,5	135,8	387,6	0,116	0,014

Las columnas corresponden, de izquierda a derecha, al número de resultados positivos en la bolsa *Quanti-Tray*, al valor del NMP, a los límites inferiores y superiores de confianza del 95%, y a los cálculos estimados de incertidumbre para cada valor NMP. Fuente: Hoja de cálculo G0903, anexo II.

A partir de los valores de los límites inferiores y límites superiores de la tabla 8 —*LI* y *LS*— y de la ecuación 1, se calcula la incertidumbre *U* como:

$$U = \frac{\log(LS) + \log(LI)}{3,92} \quad \text{Ecuación 1}$$

A partir del cuadrado de la incertidumbre U^2 obtenida procedemos a calcular la desviación estándar de reproducibilidad S_R , utilizada como valor de referencia, a partir de la ecuación 2.

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum U^2}{n}} = 0,123 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde *n* es el número de posibles resultados obtenidos al emplear el dispositivo *Quanti-Tray*, es decir, *n* es igual a 50.

De esta forma, el requisito de validación se cumplirá si la S_R de reproducibilidad obtenida como resultado final en la validación es igual o menor que la calculada teóricamente, es decir, es menor o igual a 0,123.

Los requisitos para cada parámetro que deben cumplirse para establecer la validez del método de ensayo quedan recogidos a continuación en la tabla 8:

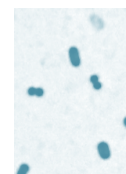


Tabla 8. Requisitos establecidos para la validación del método de recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas por NMP de dilución única.

Parámetro	Valor
Exactitud —Puntuación HPA	> 90% de la puntuación máxima
Reproducibilidad — S_R	≤ 0.123

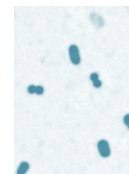
4.5.2 Resultados —Cálculo e interpretación

Para obtener los valores de exactitud y reproducibilidad de cada muestra fue necesario el desarrollo de una hoja de cálculo (anexo II, apartado B). A continuación, procedemos a explicar todos los cálculos y ecuaciones empleados para obtener los resultados de cada muestra, necesarios para la validación del método de ensayo.

Primero se realizó el recuento en las placas de TSA de *E. coli* y de *Citrobacter freundii* (figura 3). Para conocer la concentración de coliformes totales presentes en los distintos inóculos empleados durante la validación se realizó la suma de ambos recuentos, mientras que para la validación de *E. coli* se tuvieron en cuenta únicamente los recuentos en TSA de *E. coli*. Los valores obtenidos de dichos recuentos se muestran en la tabla 9, la cual presenta valores repetidos puesto que el mismo inóculo se empleó para tratar las muestras que habían sido analizadas el mismo día.

Tabla 9. Valores y medias de los recuentos en TSA obtenidos a partir de los inóculos empleados a lo largo del proceso de validación del método NMP para el recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*.

Coliformes totales			<i>Escherichia coli</i>		
X_1	X_2	X_{media}	X_1	X_2	X_{media}
62	59	60,5	18	23	20,5
62	59	60,5	18	23	20,5
62	59	60,5	18	23	20,5
62	59	60,5	18	23	20,5
62	59	60,5	18	23	20,5
123	111	117	86	70	78
123	111	117	86	70	78
123	111	117	86	70	78
123	111	117	86	70	78
123	111	117	86	70	78
139	134	136,5	58	52	55
139	134	136,5	58	52	55
139	134	136,5	58	52	55
139	134	136,5	58	52	55
139	134	136,5	58	52	55
38	45	41,5	32	36	34
38	45	41,5	32	36	34
38	45	41,5	32	36	34
38	45	41,5	32	36	34
38	45	41,5	32	36	34
59	52	55,5	30	32	31



59	52	55,5	30	32	31
59	52	55,5	30	32	31
50	41	45,5	21	16	18,5
50	41	45,5	21	16	18,5
50	41	45,5	21	16	18,5
50	41	45,5	21	16	18,5
50	41	45,5	21	16	18,5
50	41	45,5	21	16	18,5
50	41	45,5	21	16	18,5

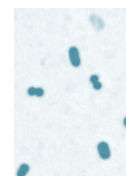
X_1 y X_2 son los valores obtenidos de referencia por valoración del inóculo, es decir, el número de ufc crecidas en las dos placas de TSA sembradas con los inóculos de trabajo correspondientes a la muestra analizada; y X_m es la media de los valores obtenidos de ambas muestras X_1 y X_2 . Fuente: Hoja de cálculo G0903, anexo II.

El paso siguiente requiere el recuento de pocillos positivos del dispositivo *Quanti-Tray* —proceso explicado en el punto 3.3.3. correspondiente al apartado Metodología— y, a partir de los resultados obtenidos, el uso de la tabla 7 para determinar el Número más probable y el intervalo de confianza del resultado de cada muestra. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados del método a validar para (A) coliformes totales y (B) *Escherichia coli*, con sus respectivas medias y límites de confianza superiores e inferiores.

(A)

Y_1	LI_1	LS_1	Y_2	LI_2	LS_2	Y_{media}
45	31,5	65,6	50	35,4	72,5	47,5
29	19	43,9	39	26,4	56,6	34
56	39,7	80,1	48	33,4	69	52
62	44,6	88,8	48	33,4	69	55
66	47,2	93,7	48	33,4	69	57
101	73,1	146	89	63,9	126,2	95
89	63,9	126,2	109	78,6	158,7	99
95	68,2	135,4	89	63,9	126,2	92
95	68,2	135,4	101	73,1	146	98
109	78,6	158,7	109	78,6	158,7	109
89	63,9	126,2	109	78,6	158,7	99
95	68,2	135,4	95	68,2	135,4	95
89	63,9	126,2	78	56,4	111,2	83,5
101	73,1	146	130	92,7	195	115,5
70	50	99	118	85	174,5	94
45	31,5	65,6	59	42	84,4	52
32	21,8	48,7	50	35,4	72,5	41
41	28	59,5	62	44,6	88,8	51,5
48	33,4	69	38	26,4	56,6	43
50	35,4	72,5	50	35,4	72,5	50
50	35,4	72,5	45	31,5	65,6	47,5
66	47,2	93,7	56	39,7	80,1	61
48	33,4	69	66	47,2	93,7	57
31	20,4	46,3	38	26,4	56,6	34,5
45	31,5	65,6	53	37,5	76,2	49
32	21,8	48,7	34	23,3	51,2	33
29	19	43,9	34	23,3	51,2	31,5
27	17,7	41,6	43	29,7	62,5	35
24	15,3	37,3	32	21,8	48,7	28
29	19	43,9	36	24,7	56,6	32,5



(B)

Y ₁	LI ₁	LS ₁	Y ₂	LI ₂	LS ₂	Y _{media}
11	6,1	20,5	8	35,4	72,5	9,5
14	7,9	23,9	10	5,3	18,8	12
11	6,1	20,5	14	7,9	23,9	12,5
14	7,9	23,9	11	6,1	20,5	12,5
12	7	22,1	11	6,1	20,5	11,5
83	59,9	118,3	70	50	99	76,5
83	59,9	118,3	95	68,2	135,4	89
74	53,1	104,8	74	53,1	104,8	74
78	56,4	111,2	95	68,2	135,4	86,5
89	63,9	126,2	95	78,6	158,7	92
59	42	84,4	62	44,6	88,8	60,5
59	42	84,4	56	39,7	80,1	57,5
45	31,5	65,6	50	35,4	72,5	47,5
66	47,2	93,7	59	42	84,4	62,5
53	37,5	76,2	62	44,6	88,8	57,5
36	24,7	53,9	41	28	59,5	38,5
31	20,4	46,3	38	26,4	56,6	34,5
36	24,7	53,9	41	28	59,5	38,5
41	28	59,5	29	19	43,9	35
43	29,7	62,5	38	26,4	56,6	40,5
34	23,3	51,2	24	21,8	48,7	29
41	28	59,5	41	28	59,5	41
34	23,3	51,2	43	29,7	62,5	38,5
19	11,9	31,3	22	14,4	35,2	20,5
25	16,5	39,4	32	21,8	48,7	28,5
15	15,3	37,3	22	14,4	35,2	18,5
16	9,8	27,5	21	13	33,3	18,5
19	11,9	31,3	25	16,5	39,4	22
16	9,8	27,5	14	7,9	23,9	15
22	14,4	35,2	24	15,3	37,3	23

Y₁ e Y₂ son los valores obtenidos del NMP para las muestras en el laboratorio en condiciones de reproducibilidad. LS₁ y LS₂ son los límites superiores y LI₁ y LI₂ los inferiores del intervalo de confianza al 95% para Y₁ e Y₂ respectivamente. Fuente: Hoja de cálculo G0903, anexo II.

Para el cálculo de la Puntuación HPA se emplea la ecuación 3, a partir de ella se obtienen las puntuaciones de las distintas muestras que permiten evaluar la recuperación, es decir, la diferencia entre lo que se ha inoculado inicialmente y lo que se ha recuperado mediante la aplicación del método.

El valor HPA es el cociente de la diferencia entre los logaritmos decimales de las medias de los valores de referencia y los valores obtenidos del NMP en valor absoluto (tabla 11), y la desviación estándar considerada como referencia.

$$HPA = \frac{\log X_m - \log Y_m}{S_R} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

X_m es la media de los valores de referencia obtenidos.

Y_m es la media de los valores al aplicar el procedimiento.

S_R de referencia calculada en la ecuación 2.

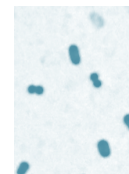


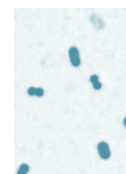
Tabla 11. Valores logarítmicos de X e Y, y valores HPA obtenidos con su puntuación correspondiente para (A) coliformes totales y para (B) *E. coli*. Fuente: Hoja de cálculo G0903, anexo II.

(A)

$\log X_{\text{media}}$	$\log Y_1$	$\log Y_2$	$\log Y_{\text{media}}$	$\log X_m - \log Y_m$	HPA	PUNTUACIÓN
1,782	1,653	1,699	1,677	0,105	0,854	3
1,782	1,462	1,591	1,531	0,250	2,035	3
1,782	1,748	1,681	1,716	0,066	0,535	3
1,782	1,792	1,681	1,740	0,041	0,337	3
1,782	1,820	1,681	1,756	0,026	0,210	3
2,068	2,004	1,949	1,978	0,090	0,735	3
2,068	1,949	2,037	1,996	0,073	0,590	3
2,068	1,978	1,949	1,964	0,104	0,849	3
2,068	1,978	2,004	1,991	0,077	0,626	3
2,068	2,037	2,037	2,037	0,031	0,250	3
2,135	1,949	2,037	1,996	0,139	1,134	3
2,135	1,978	1,978	1,978	0,157	1,280	3
2,135	1,949	1,892	1,922	0,213	1,735	3
2,135	2,004	2,114	2,063	0,073	0,590	3
2,135	1,845	2,072	1,973	0,162	1,317	3
1,618	1,653	1,771	1,716	-0,098	0,796	3
1,618	1,505	1,699	1,613	0,005	0,043	3
1,618	1,613	1,792	1,712	-0,094	0,762	3
1,618	1,681	1,580	1,633	-0,015	0,125	3
1,618	1,699	1,699	1,699	-0,081	0,658	3
1,744	1,699	1,653	1,677	0,068	0,550	3
1,744	1,820	1,748	1,785	-0,041	0,334	3
1,744	1,681	1,820	1,756	-0,012	0,094	3
1,658	1,491	1,580	1,538	0,120	0,977	3
1,658	1,653	1,724	1,690	-0,032	0,262	3
1,658	1,505	1,531	1,519	0,139	1,134	3
1,658	1,462	1,531	1,498	0,160	1,298	3
1,658	1,431	1,633	1,544	0,114	0,926	3
1,658	1,380	1,505	1,447	0,211	1,714	3
1,658	1,462	1,556	1,512	0,146	1,188	3
PROMEDIO				0,073	SUMATORIO	90

(B)

$\log X_{\text{media}}$	$\log Y_1$	$\log Y_2$	$\log Y_{\text{media}}$	$\log X_m - \log Y_m$	HPA	PUNTUACIÓN
1,312	1,041	0,903	0,978	0,334	2,716	2
1,312	1,146	1,000	1,079	0,233	1,891	3
1,312	1,041	1,146	1,097	0,215	1,747	3
1,312	1,146	1,041	1,097	0,215	1,747	3
1,312	1,079	1,041	1,061	0,251	2,041	3
1,892	1,919	1,845	1,884	0,008	0,069	3
1,892	1,919	1,978	1,949	-0,057	0,466	3
1,892	1,869	1,869	1,869	0,023	0,186	3
1,892	1,892	1,978	1,937	-0,045	0,365	3
1,892	1,949	1,978	1,964	-0,072	0,583	3
1,740	1,771	1,792	1,782	-0,041	0,337	3
1,740	1,771	1,748	1,760	-0,019	0,157	3
1,740	1,653	1,699	1,677	0,064	0,518	3



1,740	1,820	1,771	1,796	-0,056	0,451	3
1,740	1,724	1,792	1,760	-0,019	0,157	3
1,531	1,556	1,613	1,585	-0,054	0,439	3
1,531	1,491	1,580	1,538	-0,006	0,052	3
1,531	1,556	1,613	1,585	-0,054	0,439	3
1,531	1,613	1,462	1,544	-0,013	0,102	3
1,531	1,633	1,580	1,607	-0,076	0,618	3
1,491	1,531	1,380	1,462	0,029	0,235	3
1,491	1,613	1,613	1,613	-0,121	0,987	3
1,491	1,531	1,633	1,585	-0,094	0,765	3
1,267	1,279	1,342	1,312	-0,045	0,362	3
1,267	1,398	1,505	1,455	-0,188	1,526	3
1,267	1,176	1,342	1,267	0,000	0,000	3
1,267	1,204	1,322	1,267	0,000	0,000	3
1,267	1,279	1,398	1,342	-0,075	0,612	3
1,267	1,204	1,146	1,176	0,091	0,740	3
1,267	1,342	1,380	1,362	-0,095	0,769	3
PROMEDIO				0,011	SUMATORIO	89

La incertidumbre se define como la estimación que caracteriza al intervalo de valores en el que se sitúa el valor verdadero de una magnitud medida con una alta probabilidad (Camaró *et al.*, 2013). Para el cálculo de la incertidumbre del presente método fue necesario calcular, a partir de la ecuación 4, la desviación estándar de la reproducibilidad de cada par de valores obtenidos por la aplicación del método en una misma muestra, es decir, calcular S_r .

$$S_r^2 = \frac{(\log Y_1 - \log Y_2)^2}{2} \quad \text{Ecuación 4}$$

De esta forma, la contribución a la incertidumbre será debida únicamente a la precisión en condiciones de reproducibilidad. A partir del promedio de todas las S_r^2 obtenidas calculamos la incertidumbre calculada U_c a partir de la ecuación 5.

$$U_c = \pm \sqrt{\bar{S}_r^2} \quad \text{Ecuación 5}$$

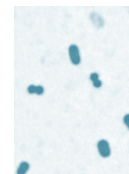
La estimación de la incertidumbre expandida I_{TOTAL} asociada al método se obtiene gracias a la ecuación 6, siendo K igual a 2 para un nivel de confianza del 95%.

$$I_{TOTAL} = K \cdot U_c \quad \text{Ecuación 6}$$

A continuación procedemos a calcular $U_{d\text{ media}}$, empleando las ecuaciones 7 y 8, que es la variabilidad intrínseca a la estimación por el método del NMP debida a la distribución de los microorganismos en la muestra. Ésta se calcula a partir de los límites superiores e inferiores de los intervalos de confianza del 95%, proporcionados por la tabla 7, para cada uno de los resultados (Y_1 e Y_2). Al tratarse de dos resultados deberemos hacer la media de ambos (ecuación 9).

$$U_{d1}^2 = \left(\frac{\log LS_1 - \log LI_1}{3.92} \right)^2 \quad U_{d2}^2 = \left(\frac{\log LS_2 - \log LI_2}{3.92} \right)^2 \quad \text{Ecuaciones 7 y 8}$$

$$U_{d\text{ media}}^2 = \frac{U_{d1}^2 + U_{d2}^2}{2} \quad \text{Ecuación 9}$$



También debe calcularse la incertidumbre operacional, que es aquella debida a la sobredispersión. Ésta se nombra como O^2 y se calcula como la diferencia de la varianza de la reproducibilidad y la variabilidad intrínseca del método, empleando la ecuación 10. En el caso de obtenerse un valor negativo o cero esta contribución se desprecia.

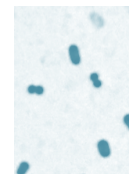
$$O^2 = S_r^2 - U_d^2 \quad \text{Ecuación 10}$$

En la tabla 12 podemos ver los resultados obtenidos, para cada muestra, de desviación estándar de reproducibilidad, de incertidumbre intrínseca del método y de incertidumbre operacional, asociados tanto al recuento de coliformes totales como de *Escherichia coli*. Todos estos datos calculados a partir de las ecuaciones 4 - 10 como se ha explicado previamente.

Tabla 12. Varianza de reproducibilidad, incertidumbre intrínseca del método de cada par de valores y su media, e incertidumbre operacional; datos asociados al recuento de (A) coliformes totales y (B) *Escherichia coli*. Fuente: Hoja de cálculo G0903, anexo II.

(A)

	S_r^2	U_1^2	U_2^2	U_d^2	O^2
	0,001	0,007	0,006	0,006	-0,005
	0,008	0,009	0,007	0,008	0,000
	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000
	0,010	0,006	0,006	0,006	0,003
	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
	0,004	0,006	0,006	0,006	-0,002
	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,005
	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,005
	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
	0,004	0,006	0,006	0,006	-0,002
	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
	0,006	0,006	0,007	0,006	0,000
	0,026	0,006	0,006	0,006	0,020
	0,007	0,007	0,006	0,006	0,001
	0,019	0,008	0,006	0,007	0,012
	0,016	0,007	0,006	0,006	0,010
	0,005	0,006	0,007	0,007	-0,002
	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
	0,001	0,006	0,007	0,006	-0,005
	0,003	0,006	0,006	0,006	-0,003
	0,010	0,006	0,006	0,006	0,003
	0,004	0,008	0,007	0,008	-0,004
	0,003	0,007	0,006	0,006	-0,004
	0,000	0,008	0,008	0,008	-0,007
	0,002	0,009	0,008	0,008	-0,006
	0,020	0,009	0,007	0,008	0,013
	0,008	0,010	0,008	0,009	-0,001
	0,004	0,009	0,008	0,009	-0,004
PROMEDIO	0,006			0,007	-0,001



(B)

S_r^2	U_1^2	U_2^2	U_d^2	O^2
0,010	0,018	0,006	0,012	-0,003
0,011	0,015	0,020	0,017	-0,007
0,005	0,018	0,015	0,017	-0,011
0,005	0,015	0,018	0,017	-0,011
0,001	0,016	0,018	0,017	-0,016
0,003	0,006	0,006	0,006	-0,003
0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
0,004	0,006	0,006	0,006	-0,002
0,000	0,006	0,006	0,006	-0,005
0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
0,001	0,007	0,006	0,006	-0,005
0,001	0,006	0,006	0,006	-0,005
0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
0,002	0,007	0,007	0,007	-0,006
0,004	0,008	0,007	0,008	-0,004
0,002	0,007	0,007	0,007	-0,006
0,011	0,007	0,009	0,008	0,004
0,001	0,007	0,007	0,007	-0,006
0,011	0,008	0,008	0,008	0,004
0,000	0,007	0,007	0,007	-0,007
0,005	0,008	0,007	0,007	-0,002
0,002	0,011	0,010	0,011	-0,009
0,006	0,009	0,008	0,009	-0,003
0,014	0,010	0,010	0,010	0,004
0,007	0,013	0,011	0,012	-0,005
0,007	0,011	0,009	0,010	-0,003
0,002	0,013	0,015	0,014	-0,012
0,001	0,010	0,010	0,010	-0,009
PROMEDIO	0,004		0,009	-0,005

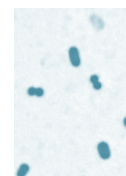
Para el cálculo del porcentaje de recuperación del método se empleó la ecuación 11, a partir del promedio de las diferencias logarítmicas de los valores de referencia y de los resultados obtenidos del método del NMP de dilución única.

$$\% \text{ Rec. método} = 10^{-(\log X_m - \log Y_m)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

Los resultados obtenidos en la validación del método NMP para el recuento de coliformes totales y de *Escherichia coli* quedan detallados en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados de la validación del método NMP por recuento de (A) coliformes totales y (B) *Escherichia coli*.

	Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>
O^2	0	0
Rec. método %	84,471	97,480
S_r	0,076	0,0633
I_{TOTAL}	0,152	0,127
Puntuación HPA	$90 \geq 81$	$89 \geq 81$



Como puede observarse, todos ellos cumplen con los requisitos establecidos. Por esta razón el método se considera válido y, por lo tanto, adecuado para la vigilancia y el control microbiológico de muestras de agua de consumo humano.

Todas las ecuaciones empleadas para el desarrollo de la hoja de cálculo, y la obtención de todos los resultados de la validación, fueron tomadas del *Procedimiento para validación de métodos microbiológicos* del LSPV, que está basado en las siguientes normas ISO:

- ISO 13843:2000. *Guía para la validación de métodos microbiológicos*. Calidad del agua.
- ISO 16140:2003. *Protocolo para la validación de métodos alternativos*. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal.
- UNE-EN ISO 17994:2004. *Criterios para establecer la equivalencia entre métodos microbiológicos*. Calidad del agua.

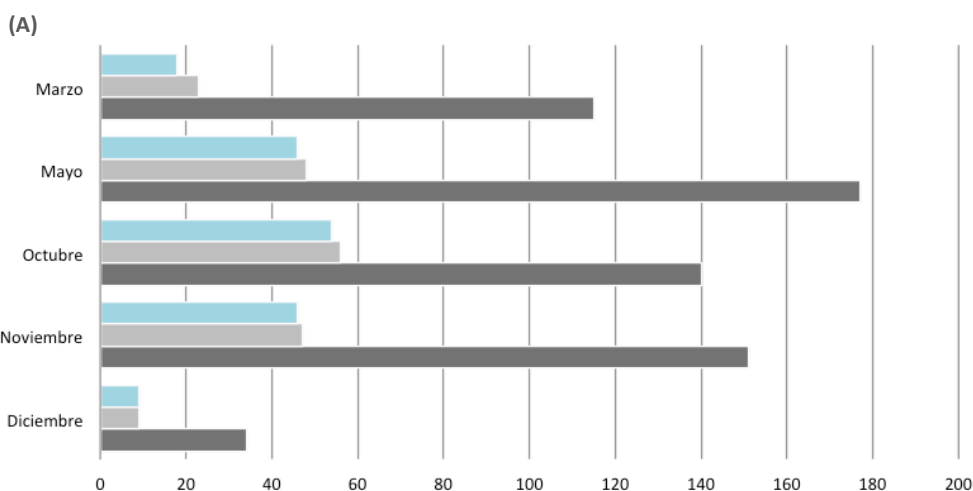
4.6. Resultados obtenidos de las muestras analizadas por el método validado

Mediante una búsqueda en la base de datos del sistema *LIMS*, software empleado en el LSPV, se han recopilado los resultados de los recuentos de las muestras de agua de consumo humano que fueron analizadas mediante el método validado tratado en el presente estudio. Estas muestras fueron analizadas durante 8 meses a lo largo de los años 2015 y principios del año 2016 y sus resultados quedan recogidos en la tabla 14.

Tabla 14. Muestras totales analizadas, muestras positivas generales y muestras positivas para coliformes totales y *Escherichia coli* en el LSPV por el método validado. Fuente: datos sistema *LIMS*.

Muestras analizadas en 2015					Muestras analizadas en 2016				
Mes	Totales	Positivas	Positivas		Mes	Totales	Positivas	Positivas	
			CT	EC				CT	EC
Marzo	115	23	18	5	Febrero	138	19	18	5
Mayo	177	48	46	6	Marzo	127	40	39	6
Octubre	140	56	54	9	Abril	141	39	36	9
Noviembre	151	47	46	30	Mayo	200	47	47	14
Diciembre	34	9	9	5					

A partir de los datos de la tabla 14 realizamos un diagrama de barras en el que se puede observar el número total de muestras analizadas, las muestras que presentan contaminación por cualquier microorganismo y las que están contaminadas por CT y ET (figura 9).



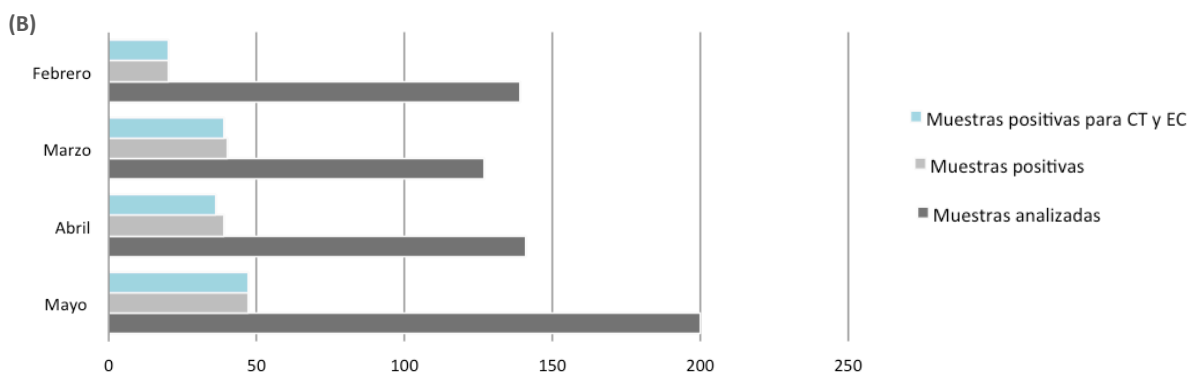
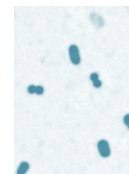


Figura 9. Gráfico comparativo sobre los resultados obtenidos mensualmente a partir del método validado: (A) año 2015 y (B) año 2016. Fuente: datos sistema LIMS.

Puede observarse que la cantidad de muestras que presentan contaminación representan entre un 20% y un 40% del total de muestras analizadas durante todos los meses. Y además, como puede apreciarse en la figura 9, todas las muestras con resultados positivos para contaminación por microorganismos presentan casi en su totalidad contaminación de origen fecal.

A partir de los resultados positivos para estas bacterias coliformes, en la figura 10 se representa un diagrama circular que refleja los porcentajes de muestras que presentan este tipo contaminación atendiendo a su origen.

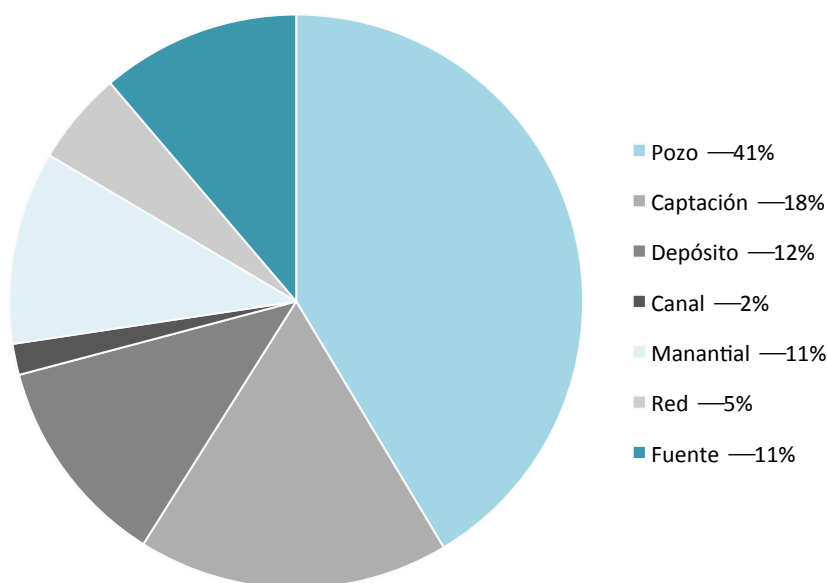
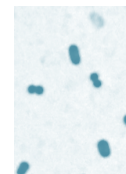


Figura 10. Gráfico porcentual de muestras positivas para coliformes totales y *Escherichia coli* según el origen del agua de consumo humano. Fuente: datos sistema LIMS.

Como puede observarse en la figura 10, la mayor proporción de aguas de consumo humano que presentan contaminación de origen fecal son las aguas de los pozos. Estas aguas representan el 41% de todas las muestras positivas analizadas por el método validado presentado en el estudio, seguidas por las aguas de captación y las aguas de depósitos.

Por otro lado, las aguas menos contaminadas son las aguas de red de abastecimiento ya que son las aguas consideradas potables que se distribuyen a núcleos de población una vez han recibido un tratamiento de cloración adecuado.

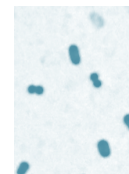


5. CONCLUSIONES

1. A la vista de los resultados obtenidos en este estudio debe destacarse la importancia de un control estricto de calidad del agua dado que nos permite garantizar la inocuidad de la misma, prevenir los factores de riesgo sanitarios, y proteger y promover la salud y el bienestar de la población.
2. La evaluación de la calidad del agua mediante el empleo de bacterias indicadoras de contaminación fecal (coliformes totales y *Escherichia coli*) es un método eficaz ya que éstas presentan un comportamiento similar al de los patógenos, su identificación es más sencilla y requiere menos tiempo y, además, su coste es menor.
3. El método descrito en este trabajo es válido para el control microbiológico del agua puesto que cumple con los requisitos de exactitud y precisión exigidos en la validación.
4. Este método, en comparación con otros existentes empleados para el recuento de bacterias indicadoras de contaminación de origen fecal, cuenta con la ventaja de ser altamente fiable, sensible y específico. Por otro lado la metodología del mismo es rápida y sencilla, y no requiere un excesivo entrenamiento del personal técnico.
5. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el proyecto, puede determinarse que el mayor porcentaje de contaminación fecal se encuentra en pozos y captaciones. Esto es lógico pues son aguas que no han sido sometidas a ningún tipo de tratamiento de potabilización, que sería necesario para proporcionar un agua apta para el consumo humano.
6. En este estudio la presencia de bacterias coliformes se detectó únicamente en un 5% de las aguas de red analizadas, hecho que puede estar relacionado con un mantenimiento incorrecto de la red de distribución y/o instalación interior.
7. Cabe destacar que la calidad sanitaria del agua de red es apta para el consumo humano en el 95% de los casos restantes. Esto determina que los tratamientos de potabilización (cloración) aplicados a las aguas de consumo humano para su distribución en red son adecuados y altamente eficaces. Esta alta calidad del agua de bebida, de uso doméstico, comercial e industrial es fundamental para mantener el bienestar de la población.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bell, C. y Kyriades, A. (2000). *E. Coli: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. Editorial Acribia, D. L. Zaragoza.
- Cabral, J. P. S. (2010). *Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7: 3657-3703.
- Camaró, M. L., Catalá, V., Gimeno, C., Martínez, R. y Olmos, P. (2013). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. Procedimientos en Microbiología Clínica (n. 48). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Campos, C. (2001). Indicadores de contaminación fecal del agua, en: *Agua Potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas*. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua.



Chacón, L. E., Villarreal, J. A. y Villarreal, J. L. (2002). *Comparación de dos métodos de número mas probable (NMP) con la cuenta viable en placa (CVP) y evaluación de la calidad del agua de la ciudad de Saltillo, Coahuila*. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, AIDIS.

Conselleria de Sanidad (2005). *Plan de Salud de la Comunidad Valenciana 2005 - 2009*.

Entidad Nacional de Acreditación (2015). *Análisis Microbiológico: Documento aclaratorio*. NT. 32 (rev. 5).

Health Protection Agency (2011). *Draft Accreditation Report*. UK Standards for Microbiology Investigations.

Köster, W., Egli, T., Ashbolt, N., Botzenhart, K., Burlion, N., Endo, T., Grimont, P., Guillot, E., Mabilat, C., Newport, L., Niemi, M., Payment, P., Prescott, A., Renaud, P. and Rust, A. (2003). Analytical methods for microbiological water quality testing, en: *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving approaches and methods*. World Health Organization and the Organisation for Economic Co-operation and Development. IWA Publishing.

Larrea, J. A., Rojas, M. M., Romeu, B., Rojas, N. M. y Heydrich, M. (2013). *Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Volumen 44, número 3.

Martí, P., Roselló, S., Llopis, A., Camaró, M. L. y Morales, M.M. (2013). *Vigilancia de la calidad microbiológica de las aguas de consumo humano y que vayan a ser destinadas a su consumo en la provincia de Valencia durante el período 2002 - 2010*. Revista Salud Ambiental 2013;13(2):137-147.

Medema, G. J., Payment, P., Dufour, A., Robertson, W., Waite, M., Hunter, P. and Kirby, R. (2003). Safe drinking water: an ongoing challenge, en: *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving approaches and methods*. World Health Organization and the Organisation for Economic Co-operation and Development. IWA Publishing.

Organización Mundial de la Salud (2008). *Guías para la calidad del agua potable*. Primer apéndice a la tercera edición. Volumen 1: Recomendaciones.

IDEXX Laboratories, Inc. (2015). *Manual de uso del Kit de análisis Colilert-18*.

IDEXX Laboratories, Inc. (2015). *Manual de uso del dispositivo Quanti-Tray*.

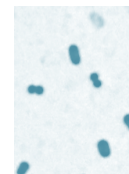
Procedimiento Interno (2013). *Control interno de los ensayos microbiológicos* (rev. 4). Laboratorio de Salud Pública de Valencia.

Procedimiento Interno - A (2014). *Métodos de detección y recuento en microbiología. Cálculo y expresión de resultados* (rev. 4). Laboratorio de Salud Pública de Valencia.

Procedimiento Interno (2015). *Método de filtración en membrana para el análisis microbiológico de aguas* (rev. 3). Laboratorio de Salud Pública de Valencia.

Procedimiento Interno - B (2014). *Procedimiento para validación de métodos microbiológicos* (rev. 10). Laboratorio de Salud Pública de Valencia.

Procedimiento Interno - C (2014). *Recuento de coliformes y Escherichia coli por NMP en aguas* (rev. 2). Laboratorio de Salud Pública de Valencia.



Public Health England (2014). *Standards for Microbiology Investigations*. Consultado en: <https://www.gov.uk/government/collections/standards-for-microbiology-investigations-smi>

Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., and Leung, K. T. (2005). *Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective*. Water, Air, and Soil Pollution (2005) 166: 139-166.

Tomás, D., Bosch, A., Catalán, V., Rosa, P., Rodríguez, M. y Rodríguez, D. (2007). *Informe técnico sobre normalización de métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicados al análisis microbiológico de aguas y alimentos*. Comisión de Normalización y Validación. Sociedad Española de Microbiología.

Vargas, C. (1983). Determinación del número más probable de coliformes totales por la técnica de los tubos múltiples, en: *Métodos simplificados de análisis microbiológicos de aguas residuales*. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. CEPIS, Lima.

7. REFERENCIAS LEGISLATIVAS

ISO 9308-2:1990. *Método del tubo múltiple (número más probable)*, en: Detección y recuento de microorganismos coliformes, microorganismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli*. Calidad del agua, International Organization for Standardization.

ISO 9000:2000. *Sistemas de gestión de calidad*. Estándares de calidad para instituciones, International Organization for Standardization.

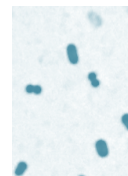
UNE-EN ISO 9308-1:2001. *Método de filtración en membrana*, en: Detección y recuento de *Escherichia Coli* y de bacterias coliformes. Calidad del agua, International Organization for Standardization.

UNE-EN ISO 7218:2008. *Microbiología de los alimentos y de los preparados alimenticios para animales*. Reglas generales para el recuento microbiológico. International Organization for Standardization.

ISO 9308-2:2012. *Método del número más probable*, en: Enumeración de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Calidad del agua, International Organization for Standardization.

Real Decreto 140/2003, del 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado.





8. ANEXOS

ANEXO I. FICHAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE VALENCIA

A. Ficha de trabajo F0007

LSPV	MICROBIOLOGÍA
------	---------------

FECHA INICIO ANÁLISIS:

Nº REGISTRO:

GRUPO: AGUA DE CONSUMO HUMANO

SIEMBRA		LECTURA			
LOTE MEDIO	TECNICO FECHA	TECNICO FECHA	DILU- CIÓN	RECuento	RESULTADO
PEE/LSPV/ 070 RTO. AEROBIOS MESÓFILOS A 22°C					
PC					
PEE/LSPV/ 267 RTO. COLIFORMES					
COLILERT					
PEE/LSPV/ 267 RTO E. COLI			1193045		
COLILERT					
PEE/LSPV/ 109 RTO. C. PERFRINGENS					
TSC					
mCP					
PEE/LSPV/ 072 RTO ENTEROCOCOS					
SB					
ABE					

OBSERVACIONES:

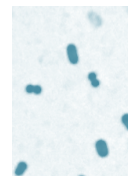
FECHA FIN DE ANÁLISIS:

PASADO POR:

FECHA:

AUTORIZADO POR:

FECHA:



B. Ficha de trabajo F0009

GRUPO: AGUAS DE CONSUMO HUMANO

FECHA INICIO ANÁLISIS/TÉCNICO:

CABINA	BOMBA DE VACÍO	RAMPA DE FILTRACIÓN
COD.	CÓD.	CÓD.
COD.	CÓD.	CÓD.
LOTE: EMBUDO / MEMBRANA FILTRACIÓN/ FRASCO		

Nº REGISTRO	FECHA ENTRADA	Nº REGISTRO	FECHA ENTRADA

DILUYENTE/PREENRIQUECIMIENTO

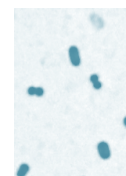
LOTE	MEDIO	OBSERVACIONES	EQUIPO
	AP 0,1%	Preparación diluciones	
	ADE	CNP	

SIEMBRAS:

TÉCNICO:

COD. PIPETA:

LOTE	MEDIO	VOLUMEN FILTRADO/DILUCIONES SEMBRADAS	EQUIPO
	PC	1ml/ -1	
	COLILERT-18	100 ml	
	SB	100 ml	
	TSC	100 ml	



ANEXO II. HOJA DE CÁLCULO DE VALIDACIÓN Y CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE ENSAYOS DE RECUENTO POR NMP EN MICROBIOLOGÍA DEL LSPV

Hoja de cálculo G0639

■ S_R , NMP:

POCILLOS +	NMP	LI	LS	S_R	S_R^2
1	1,0	0,3	5,6	0,324251728	0,105139183
2	2,0	0,6	7,3	0,276829492	0,076634568
3	3,1	1,1	9	0,232869853	0,054228368
4	4,2	1,7	10,7	0,203809912	0,04153848
5	5,3	2,3	12,3	0,185759509	0,034506595
6	6,4	3,0	13,9	0,169870802	0,02885609
7	7,5	3,7	15,5	0,158706626	0,025187793
8	8,7	4,5	17,1	0,147903979	0,021875587
9	9,9	5,3	18,8	0,140276015	0,01967736
10	11,1	6,1	20,5	0,134291843	0,018034299
11	12,4	7	22,1	0,127370978	0,016223366
12	13,7	7,9	23,9	0,122645615	0,015041947
13	15,0	8,8	25,7	0,11873736	0,014098561
14	16,4	9,8	27,5	0,114312913	0,013067442
15	17,8	10,8	29,4	0,110949892	0,012309878
16	19,2	11,9	31,3	0,107142188	0,011479448
17	20,7	13	33,3	0,104209408	0,010859601
18	22,2	14,1	35,2	0,101358049	0,010273454
19	23,8	15,3	37,3	0,098728929	0,009747401
20	25,4	16,5	39,4	0,096431703	0,009299073
21	27,1	17,7	41,6	0,094673486	0,008963069
22	28,8	19	43,9	0,092783398	0,008608759
23	30,6	20,4	46,3	0,090803782	0,008245327
24	32,4	21,8	48,7	0,089049099	0,007929742
25	34,4	23,3	51,2	0,087222969	0,007607846
26	36,4	24,7	53,9	0,086451993	0,007473947
27	38,4	26,4	56,6	0,084492986	0,007139065
28	40,6	28	59,5	0,083509932	0,006973909
29	42,9	29,7	62,5	0,082429482	0,006794619
30	45,3	31,5	65,6	0,081273797	0,00660543
31	47,7	33,4	69	0,080383322	0,006461479
32	50,4	35,4	72,5	0,079422129	0,006307875
33	53,1	37,5	76,2	0,078551965	0,006170411
34	56,0	39,7	80,1	0,077765819	0,006047523
35	59,1	42	84,4	0,077319683	0,005978333
36	62,4	44,6	88,8	0,076295435	0,005820993
37	65,9	47,2	93,7	0,075968774	0,005771255
38	69,7	50	99	0,075679895	0,005727447
39	73,8	53,1	104,8	0,075323153	0,005673577
40	78,2	56,4	111,2	0,075210633	0,005656639
41	83,1	59,9	118,3	0,075397429	0,005684772
42	88,5	63,9	126,2	0,075397576	0,005684794
43	94,5	68,2	135,4	0,075978135	0,005772677
44	101,3	73,1	146	0,076641704	0,005873951
45	109,1	78,6	158,7	0,077845505	0,006059923
46	118,4	85	174,5	0,079687884	0,006350159
47	129,8	92,7	195	0,082386448	0,006787527
48	144,5	102,3	224,1	0,086879138	0,007547985
49	165,2	115,2	272,2	0,095264194	0,009075267
50	200,5	135,8	387,6	0,116194898	0,013501254

MEDIA	0,111254829	0,122993825
-------	-------------	-------------

■ PEE/LSPV/267 Recuento de coliformes por NMP en aguas:

NºR	Fecha	X ₁	X ₂	X _{media}	Y ₁	L ₁	LS ₁	Y ₂	L ₂	LS ₂	Y _{media}
1098 A-B	Día 1	62	59	60,5	45	31,5	65,6	50	35,4	72,5	47,5
1999 A-B		62	59	60,5	29	19	43,9	39	26,4	56,6	34
1100 A-B		62	59	60,5	56	39,7	80,1	48	33,4	69	52
1101 A-B		62	59	60,5	62	44,6	88,8	48	33,4	69	55
1102 A-B	Día 2	62	59	60,5	66	47,2	93,7	48	33,4	69	57
2124 A-B		123	111	117	101	73,1	146	89	63,9	126,2	95
2125 A-B		123	111	117	89	63,9	126,2	109	78,6	158,7	99
2126 A-B		123	111	117	95	68,2	135,4	89	63,9	126,2	92
2130 A-B	Día 3	123	111	117	95	68,2	135,4	101	73,1	146	98
2131 A-B		123	111	117	109	78,6	158,7	109	78,6	158,7	109
2197 A-B		139	134	136,5	89	63,9	126,2	109	78,6	158,7	99
2198 A-B		139	134	136,5	95	68,2	135,4	95	68,2	135,4	95
2199 A-B	Día 4	139	134	136,5	89	63,9	126,2	78	56,4	111,2	83,5
2201 A-B		139	134	136,5	101	73,1	146	130	92,7	195	115,5
2202 A-B		139	134	136,5	70	50	99	118	85	174,5	94
2427 A-B		38	45	41,5	45	31,5	65,6	59	42	84,4	52
2428 A-B	Día 5	38	45	41,5	32	21,8	48,7	50	35,4	72,5	41
2429 A-B		38	45	41,5	41	28	59,5	62	44,6	88,8	51,5
2432 A-B		38	45	41,5	48	33,4	69	38	26,4	56,6	43
2433 A-B		38	45	41,5	50	35,4	72,5	50	35,4	72,5	50
2737 A-B	Día 6	59	52	55,5	50	35,4	72,5	45	31,5	65,6	47,5
2738 A-B		59	52	55,5	66	47,2	93,7	56	39,7	80,1	61
2740 A-B		59	52	55,5	48	33,4	69	66	47,2	93,7	57
3118 A-B		50	41	45,5	31	20,4	46,3	38	26,4	56,6	34,5
3119 A-B	Día 7	50	41	45,5	45	31,5	65,6	53	37,5	76,2	49
3120 A-B		50	41	45,5	32	21,8	48,7	34	23,3	51,2	33
3122 A-B		50	41	45,5	29	19	43,9	34	23,3	51,2	31,5
3123 A-B		50	41	45,5	27	17,7	41,6	43	29,7	62,5	35
3124 A-B	Día 8	50	41	45,5	24	15,3	37,3	32	21,8	48,7	28
3125 A-B		50	41	45,5	29	19	43,9	36	24,7	56,6	32,5

$\log X_{media}$	$\log Y_1$	$\log Y_2$	$\log Y_{media}$	$\log X_m - \log Y_m$	HPA	PUNTUACIÓN	S_i^2	U_1^2	U_2^2	U_d^2	O^2
1,782	1,653	1,699	1,677	0,105	0,854	3	0,001	0,007	0,006	0,006	-0,005
1,782	1,462	1,591	1,531	0,250	2,035	3	0,008	0,009	0,007	0,008	0,000
1,782	1,748	1,681	1,716	0,066	0,535	3	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
1,782	1,792	1,681	1,740	0,041	0,337	3	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000
1,782	1,820	1,681	1,756	0,026	0,210	3	0,010	0,006	0,006	0,006	0,003
2,068	2,004	1,949	1,978	0,090	0,735	3	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
2,068	1,949	2,037	1,996	0,073	0,590	3	0,004	0,006	0,006	0,006	-0,002
2,068	1,978	1,949	1,964	0,104	0,849	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,005
2,068	1,978	2,004	1,991	0,077	0,626	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,005
2,068	2,037	2,037	2,037	0,031	0,250	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
2,135	1,949	2,037	1,996	0,139	1,134	3	0,004	0,006	0,006	0,006	-0,002
2,135	1,978	1,978	1,978	0,157	1,280	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
2,135	1,949	1,892	1,922	0,213	1,735	3	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
2,135	2,004	2,114	2,063	0,073	0,590	3	0,006	0,006	0,007	0,006	0,000
2,135	1,845	2,072	1,973	0,162	1,317	3	0,026	0,006	0,006	0,006	0,020
1,618	1,653	1,771	1,716	-0,098	0,796	3	0,007	0,007	0,006	0,006	0,001
1,618	1,505	1,699	1,613	0,005	0,043	3	0,019	0,008	0,006	0,007	0,012
1,618	1,613	1,792	1,712	-0,094	0,762	3	0,016	0,007	0,006	0,006	0,010
1,618	1,681	1,580	1,633	-0,015	0,125	3	0,005	0,006	0,007	0,007	-0,002
1,618	1,699	1,699	1,699	-0,081	0,658	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
1,744	1,699	1,653	1,677	0,068	0,550	3	0,001	0,006	0,007	0,006	-0,005
1,744	1,820	1,748	1,785	-0,041	0,334	3	0,003	0,006	0,006	0,006	-0,003
1,744	1,681	1,820	1,756	-0,012	0,094	3	0,010	0,006	0,006	0,006	0,003
1,658	1,491	1,580	1,538	0,120	0,977	3	0,004	0,008	0,007	0,008	-0,004
1,658	1,653	1,724	1,690	-0,032	0,262	3	0,003	0,007	0,006	0,006	-0,004
1,658	1,505	1,531	1,519	0,139	1,134	3	0,000	0,008	0,008	0,008	-0,007
1,658	1,462	1,531	1,498	0,160	1,298	3	0,002	0,009	0,008	0,008	-0,006
1,658	1,431	1,633	1,544	0,114	0,926	3	0,020	0,009	0,007	0,008	0,013
1,658	1,380	1,505	1,447	0,211	1,714	3	0,008	0,010	0,008	0,009	-0,001
1,658	1,462	1,556	1,512	0,146	1,188	3	0,004	0,009	0,008	0,009	-0,004

Promedio=	0,073		90	0,006			0,007	-0,001
-----------	-------	--	----	-------	--	--	-------	--------

■ PEE/LSPV/267 Recuento de *E. coli* por NMP en aguas:

NºR	Fecha	X ₁	X ₂	X _{media}	Y ₁	LI ₁	LS ₁	Y ₂	LI ₂	LS ₂	Y _{media}
1098 A-B	Día 1	18	23	20,5	11	6,1	20,5	8	35,4	72,5	9,5
1999 A-B		18	23	20,5	14	7,9	23,9	10	5,3	18,8	12
1100 A-B		18	23	20,5	11	6,1	20,5	14	7,9	23,9	12,5
1101 A-B	Día 1	18	23	20,5	14	7,9	23,9	11	6,1	20,5	12,5
1102 A-B		18	23	20,5	12	7	22,1	11	6,1	20,5	11,5
2124 A-B		86	70	78	83	59,9	118,3	70	50	99	76,5
2125 A-B	Día 2	86	70	78	83	59,9	118,3	95	68,2	135,4	89
2126 A-B		86	70	78	74	53,1	104,8	74	53,1	104,8	74
2130 A-B		86	70	78	78	56,4	111,2	95	68,2	135,4	86,5
2131 A-B	Día 2	86	70	78	89	63,9	126,2	95	78,6	158,7	92
2197 A-B		58	52	55	59	42	84,4	62	44,6	88,8	60,5
2198 A-B		58	52	55	59	42	84,4	56	39,7	80,1	57,5
2199 A-B	Día 3	58	52	55	45	31,5	65,6	50	35,4	72,5	47,5
2201 A-B		58	52	55	66	47,2	93,7	59	42	84,4	62,5
2202 A-B		58	52	55	53	37,5	76,2	62	44,6	88,8	57,5
2427 A-B	Día 4	32	36	34	36	24,7	53,9	41	28	59,5	38,5
2428 A-B		32	36	34	31	20,4	46,3	38	26,4	56,6	34,5
2429 A-B		32	36	34	36	24,7	53,9	41	28	59,5	38,5
2432 A-B	Día 4	32	36	34	41	28	59,5	29	19	43,9	35
2433 A-B		32	36	34	43	29,7	62,5	38	26,4	56,6	40,5
2737 A-B		30	32	31	34	23,3	51,2	24	21,8	48,7	29
2738 A-B	Día 5	30	32	31	41	28	59,5	41	28	59,5	41
2740 A-B		30	32	31	34	23,3	51,2	43	29,7	62,5	38,5
3118 A-B		21	16	18,5	19	11,9	31,3	22	14,4	35,2	20,5
3119 A-B	Día 6	21	16	18,5	25	16,5	39,4	32	21,8	48,7	28,5
3120 A-B		21	16	18,5	15	15,3	37,3	22	14,4	35,2	18,5
3122 A-B		21	16	18,5	16	9,8	27,5	21	13	33,3	18,5
3123 A-B	Día 6	21	16	18,5	19	11,9	31,3	25	16,5	39,4	22
3124 A-B		21	16	18,5	16	9,8	27,5	14	7,9	23,9	15
3125 A-B		21	16	18,5	22	14,4	35,2	24	15,3	37,3	23

$\log X_{media}$	$\log Y_1$	$\log Y_2$	$\log Y_{media}$	$\log X_m - \log Y_m$	HPA	PUNTUACIÓN	s_i^2	u_1^2	u_2^2	u_d^2	O^2
1,312	1,041	0,903	0,978	0,334	2,716	2	0,010	0,018	0,006	0,012	-0,003
1,312	1,146	1,000	1,079	0,233	1,891	3	0,011	0,015	0,020	0,017	-0,007
1,312	1,041	1,146	1,097	0,215	1,747	3	0,005	0,018	0,015	0,017	-0,011
1,312	1,146	1,041	1,097	0,215	1,747	3	0,005	0,015	0,018	0,017	-0,011
1,312	1,079	1,041	1,061	0,251	2,041	3	0,001	0,016	0,018	0,017	-0,016
1,892	1,919	1,845	1,884	0,008	0,069	3	0,003	0,006	0,006	0,006	-0,003
1,892	1,919	1,978	1,949	-0,057	0,466	3	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
1,892	1,869	1,869	1,869	0,023	0,186	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
1,892	1,892	1,978	1,937	-0,045	0,365	3	0,004	0,006	0,006	0,006	-0,002
1,892	1,949	1,978	1,964	-0,072	0,583	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,005
1,740	1,771	1,792	1,782	-0,041	0,337	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
1,740	1,771	1,748	1,760	-0,019	0,157	3	0,000	0,006	0,006	0,006	-0,006
1,740	1,653	1,699	1,677	0,064	0,518	3	0,001	0,007	0,006	0,006	-0,005
1,740	1,820	1,771	1,796	-0,056	0,451	3	0,001	0,006	0,006	0,006	-0,005
1,740	1,724	1,792	1,760	-0,019	0,157	3	0,002	0,006	0,006	0,006	-0,004
1,531	1,556	1,613	1,585	-0,054	0,439	3	0,002	0,007	0,007	0,007	-0,006
1,531	1,491	1,580	1,538	-0,006	0,052	3	0,004	0,008	0,007	0,008	-0,004
1,531	1,556	1,613	1,585	-0,054	0,439	3	0,002	0,007	0,007	0,007	-0,006
1,531	1,613	1,462	1,544	-0,013	0,102	3	0,011	0,007	0,009	0,008	0,004
1,531	1,633	1,580	1,607	-0,076	0,618	3	0,001	0,007	0,007	0,007	-0,006
1,491	1,531	1,380	1,462	0,029	0,235	3	0,011	0,008	0,008	0,008	0,004
1,491	1,613	1,613	1,613	-0,121	0,987	3	0,000	0,007	0,007	0,007	-0,007
1,491	1,531	1,633	1,585	-0,094	0,765	3	0,005	0,008	0,007	0,007	-0,002
1,267	1,279	1,342	1,312	-0,045	0,362	3	0,002	0,011	0,010	0,011	-0,009
1,267	1,398	1,505	1,455	-0,188	1,526	3	0,006	0,009	0,008	0,009	-0,003
1,267	1,176	1,342	1,267	0,000	0,000	3	0,014	0,010	0,010	0,010	0,004
1,267	1,204	1,322	1,267	0,000	0,000	3	0,007	0,013	0,011	0,012	-0,005
1,267	1,279	1,398	1,342	-0,075	0,612	3	0,007	0,011	0,009	0,010	-0,003
1,267	1,204	1,146	1,176	0,091	0,740	3	0,002	0,013	0,015	0,014	-0,012
1,267	1,342	1,380	1,362	-0,095	0,769	3	0,001	0,010	0,010	0,010	-0,009

Promedio=	0,011		89	0,004			0,009	-0,005
-----------	-------	--	----	-------	--	--	-------	--------